

Identifizierung neuer *cis*-regulatorischer Elemente durch bioinformatische und experimentelle Analyse Pathogen-induzierbarer Gene

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität
Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig zur Erlangung des Grades einer Doktorin der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von

Jeannette Koschmann, geb. Kappler
aus Braunschweig

1. Referent: apl. Professor Dr. Reinhard Hehl

2. Referent: Professor Dr. Ralf-Rainer Mendel

eingereicht am: 29.07.2009

mündliche Prüfung (Disputation) am: 12.04.2011

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Kappler J., Bülow L., Schindler M., Hehl R. Tools for database-assisted identification of *cis*-regulatory elements in pathogen-responsive genes. International conference on Arabidopsis research. Montreal, Canada 2008.

Für Elise und Heinrich
Lustinetz

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Pflanzen und Pflanzenpathogene.....	1
1.2. Aktuelle Modelle der Pflanze Pathogen Interaktion	4
1.3. Die Rolle von Signalmolekülen und Phytohormonen bei der Pathogenabwehr.....	11
1.4. Die systemisch erworbene Resistenz	15
1.5. Die Rolle der transkriptionellen Regulation bei der Pathogenabwehr	16
1.6. Die Transkriptomanalyse bei der Pflanze Pathogen Interaktion	19
1.7. Microarrays für die Analyse der Pflanze Pathogen Interaktion.....	20
1.7.1. cDNA-Microarray.....	20
1.7.2. Oligonukleotid-Microarray.....	21
1.8. Strategien zur Erzeugung resistenter Nutzpflanzen	25
1.9. Ziel dieser Arbeit	29
2. MATERIAL UND METHODEN.....	30
2.1. Material	30
2.1.1. Verwendete Microarray-Experimente.....	30
2.1.2. Software-Tools.....	31
2.1.3. Technische Geräte.....	41
2.1.4. Chemikalien und Reagenzien.....	42
2.1.5. Medien.....	44
2.1.6. Lösungen	46
2.1.7. Enzyme/Peptide.....	52
2.1.8. Kits.....	53
2.1.9. Plasmide/DNA.....	53
2.1.10. Oligonukleotide	54
2.1.11. Bakterienstämme	57
2.1.12. Antibiotika	58
2.1.13. Petersilien-Zellkultur.....	58
2.1.14. Pflanzenmaterial	58
2.2. Methoden	58
2.2.1. Plasmidminipräparation	58
2.2.2. Plasmidmaxipräparation	59
2.2.3. Agarosegelelektrophorese.....	60
2.2.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	61
2.2.5. Herstellung von elektrokompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	62
2.2.6. Transformation von <i>E. coli</i>	62
2.2.7. Restriktionsspaltungen, Dephosphorylierung und Ligation	63
2.2.8. Annealing ssDNA zu dsDNA	64
2.2.9. Polymerasekettenreaktion	64
2.2.10. Aufreinigung von PCR-Fragmenten	65
2.2.11. Sequenzierung und computergestützte Auswertung	65
2.3. Herstellung von Promoter-Reportergen-Konstrukten	67
2.4. Petersilien-Protoplasten System	69
2.4.1. Protoplastierung.....	70

2.4.2.	Aufreinigung intakter Protoplasten	71
2.4.3.	Transformation	72
2.4.4.	Ernte der transformierten Protoplasten	72
2.5.	<i>Arabidopsis</i>-Protoplasten System	73
2.5.1.	Protoplastierung	73
2.5.2.	Aufreinigung intakter Protoplasten	73
2.5.3.	Transformation	74
2.5.4.	Ernte der transformierten Protoplasten	75
2.6.	Infiltrationsanalysen	75
2.7.	β-Glucuronidase-Nachweis	77
2.8.	Luziferase-Nachweis	79
2.9.	Proteinbestimmung nach Bradford	80
3.	ERGEBNISSE	81
3.1.	Identifizierung von koregulierten Pathogen-induzierten Genen	81
3.2.	Identifizierung von 443 konservierten Sequenzmotiven in Pathogen-responsiven Genen	82
3.3.	Identifizierung von identischen Motiven	83
3.4.	Klassifizierung der identifizierten Motive	85
3.5.	Datenbankabgleich der Motivgruppen	89
3.6.	Zusammenfassung der Motivgruppen, bei denen <i>cis</i> -Elemente bekannter TF-Familien identifiziert wurden	110
3.7.	Identifizierung von Einzelmotiven für die experimentelle Untersuchung am Beispiel von 18H_M2	112
3.8.	Auswahl von Einzelsequenzen für die experimentelle Analyse am Beispiel des Motivs 18H_M2	114
3.9.	Auswahl von zwei Einzelsequenzen am Beispiel des Motivs 30I-8_M1	120
3.10.	Analyse der posttranskriptionellen Regulation der den 17 ausgewählten Einzelsequenzen zugrunde liegenden Gene	122
3.11.	Vorkommen der 17 ausgewählten Einzelsequenzen der Motive im <i>Arabidopsis thaliana</i> Genom	123
3.12.	Identifizierung von funktionellen Pathogen-responsiven <i>cis</i> - Elementen im heterologen System	126
3.13.	Überprüfung von ausgewählten Einzelsequenzen im homologen System	128
3.13.1.	Induktion durch die PAMPs Flg22, AtPep1 und AtPep2	128
3.13.2.	Induktion der Einzelsequenz 18H_M2_S1 durch die Signalmoleküle MJ und SA	128
3.14.	Durch Agroinfiltration identifizierte, funktionelle <i>cis</i> -Elemente	129
3.15.	Experimentelle Untersuchung von Effekten, die durch Kombination der Einzelsequenz 18H_M2_S1 mit dem D-Element entstehen können	131

4. DISKUSSION	134
4.1. Bioinformatische Voraussage von Pathogen-responsiven <i>cis</i>-Elementen	134
4.1.1. Motivgruppe 1 charakterisiert das <i>cis</i> -Element G-Box	138
4.1.2. Motivgruppen 2 und 3 besitzen Homologien zu ABA <i>response elements</i> (ABREs)	140
4.1.3. Motivgruppe 5 charakterisiert <i>cis</i> -Elemente mit einer TGA-Bindungssequenz	141
4.1.4. Die <i>cis</i> -Elemente der Motivgruppe 7 zeigen eine Homologie zur C-Box aus <i>Glycine max</i>	142
4.1.5. Die Motivgruppen 6, 9 und 17 besitzen sehr geringe Homologien zu Bindestellen der bZIP-Faktoren 910 und 911 aus <i>Antirrhinum majus</i>	143
4.1.6. Die Motivgruppen 12 und 18 zeigen Ähnlichkeiten zu Promotorelementen der Phenyl-Ammonium-Lyase	144
4.1.7. Die Motive der Gruppen 4, 13 und 33 weisen eine geringe Ähnlichkeit zu Bindungssequenzen von MYB-Faktoren auf	145
4.1.8. Motivgruppe 8 und 28 zeigen Sequenzhomologien zu Promotorelementen der Glycerin-Aldehyd-Dehydrogenase	146
4.1.9. Motivgruppe 20 charakterisiert Bindestellen von TFen mit einer TCP-Domäne	146
4.1.10. Motivgruppe 24 und 25 zeigen das <i>cis</i> -Element GCC-Box	147
4.1.11. Motivgruppe 27 besitzt Übereinstimmungen zur W-Box	148
4.1.12. Motivgruppe 30 zeigt Homologien zum TL1-Element	149
4.1.13. Motivgruppe 34 und 35 zeigen Sequenzähnlichkeiten zu Bindestellen von E2F-Transkriptionsfaktoren	150
4.1.14. Die Familienprofile vieler Motivgruppen besitzen geringe Homologien zu bekannten <i>cis</i> -Elementen	150
4.2. Identifizierung von Pathogen-responsiven <i>cis</i>-Elementen, die durch viele Stimuli induziert werden	151
4.3. Funktionalität ausgewählter Einzelsequenzen	152
4.3.1. Unterschiedliche Induktion im heterologen bzw. homologen System der Einzelsequenzen 30I-8_M1_S1 und 30I-8_M1_S2	156
4.3.2. Die Einzelsequenz 18H_M2_S1 ist in verschiedenen transienten Systemen induzierbar und funktionell	157
5. ZUSAMMENFASSUNG	160
6. LITERATURVERZEICHNIS	162
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	186
8. ANHANG	191
8.1. Sequenz des pBT10-GUS Vektors	191
8.2. Sequenz des pBT10-LUC Vektors	192
8.3. Liste der erstellten DNA-Konstrukte und verwendeten Oligonukleotide	193
8.4. Sequenzierungsergebnisse	196
8.5. Ergebnisse der β -Glucuronidase-Reportergenassays	198
8.6. Ergebnisse der Luziferase-Reportergenassays	202
8.7. Abfragen-Übersichtstabelle	204

1. Einleitung

1.1. Pflanzen und Pflanzenpathogene

Eine Pflanze ist ein sessiler, photoautotropher Organismus, dessen Zellen über Zellwände verfügen, hauptsächlich von einer Vakuole gefüllt sind und Plastiden besitzen (Sitte, 2002). Diese enthalten Pigmente wie das Chlorophyll, mit denen die Zelle aufgrund von Licht Energie gewinnt und diese in Form von Stärke speichert (Richter, 1998). Die Nutzung von Pflanzen durch den Menschen begann vor mehr als 12.000 Jahren in Vorderasien und Anatolien, wo Menschen die Vorläufer der ersten Getreidearten wie Gerste und Roggen anbauten und Landwirtschaft zu betreiben begannen (Schiemann, 1948). Auch heute werden Pflanzen für den menschlichen Gebrauch überwiegend als Kulturpflanzen angebaut. Die weltweit wichtigsten Nutzpflanzen (Breschke, 1991) sind Weizen (Gattung *Triticum* L.), Reis (*Oryza sativa*), Mais (*Zea mays*) und Kartoffel (*Solanum tuberosum*). Die Kartoffel steht mit einer Weltjahresproduktion von über 310 Millionen Tonnen auf einer Anbaufläche von über 19 Millionen Hektar an vierter Stelle der wichtigsten Grundnahrungspflanzen. Darüber hinaus dienen Pflanzen zur Herstellung von Kleidung, als Genuss- und Heilmittel oder als Energielieferant (Franke, 1997).

Pflanzen sind nicht beweglich und an ihrem Standort biotischen wie abiotischen Stressen ausgesetzt. Verschiedene Phytopathogene wie Bakterien, Pilze, Viren, Nematoden und Insekten (Agrios, 1997) versuchen ihrerseits die Pflanzen zu nutzen und vollziehen einen Angriff um sich lebendes oder totes Gewebe zueignen zu machen (Abbildung 1).

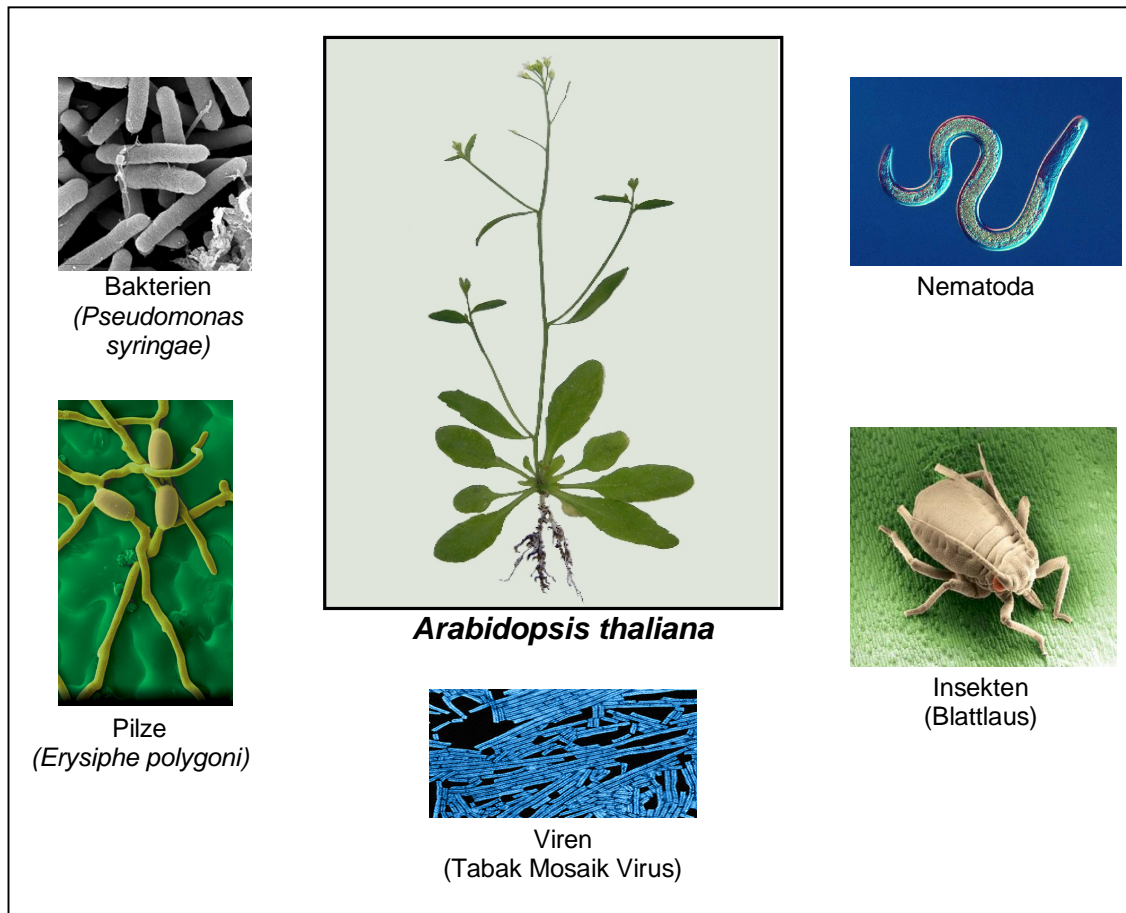


Abbildung 1: Übersicht über die Phytopathogene der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*.

Die Pathogenität (griechisch *pathos*: Leid, Krankheit; *gennan*: (er)zeugen) bezeichnet die Eigenschaft eines Objektes bei einem bestimmten Organismus eine Erkrankung auszulösen. Von den mehr als eine Million bekannten Bakterienarten sind nur 200 als phytopathogen klassifiziert wurden (Kempken und Kempken, 2006). Unter den etwa 100.000 beschriebenen Pilz-Arten gibt es ca. 8000 phytopathogene Arten, welche eine Krankheit auslösen können (Kempken und Kempken, 2006). Trotz intensiver Pflanzenschutzmaßnahmen gehen jährlich etwa 30% der Welternte durch Pflanzenpathogene und Unkräuter verloren (Oerke, 1994). Zu erwähnen ist auch der Ausbruch der Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) von 1845-1848, welche durch *Phytophthora infestans* ausgelöst wurde und in Irland zu einer großen Hungersnot geführt hat. Trotzdem sind viele Pflanzen gegenüber den meisten Phytopathogenen resistent und haben multiple Abwehrmechanismen entwickelt, um sich effektiv gegen diverse Pathogene zu wehren. Die Grundvoraussetzung einer Pflanze, den Angriff eines Pathogens zu überleben, ist die Fähigkeit zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ zu

unterscheiden. Sie stellt eine wesentliche Eigenschaft aller lebenden Organismen dar und bildet die Grundlage zur Aktivierung von Abwehrmechanismen. Diese Charakteristik wird als angeborene Immunität (*innate immunity*) bezeichnet (Nürnberg *et al.*, 2004). Pflanzen werden in Bezug auf Pathogene in Nichtwirts- und Wirtspflanzen unterschieden (Heath, 2000). Pflanzen verfügen im Gegensatz zu Wirbeltieren nicht über ein spezielles Immunabwehrsystem (Nürnberg *et al.*, 2004). Für eine Basisresistenz ist jede Pflanzenzelle mit Abwehrmechanismen ausgestattet.

Pflanzenpathogene nutzen verschiedene Lebensstrategien. Bevor es zum Ausbruch einer Krankheit kommen kann, muss das Pathogen mit einer Pflanze in engen Kontakt treten und sich auf ihr bzw. in ihr vermehren. Die Phytopathogene können über die Stomata, Hydrathoden oder Verwundungsstellen eindringen. Eine Vermehrung findet im Apoplasten oder im Xylem statt (Abramovitch *et al.*, 2006). Sichtbare Krankheitssymptome äußern sich in Chlorosen oder Nekrosen des pflanzlichen Gewebes und resultieren aus einem programmierten Zelltod (*programmed cell death*; PCD) (Alfano und Collmer, 1996). Dieser schnelle und aktive Abwehrmechanismus wird als lokale hypersensitive Reaktion (HR) bezeichnet. Das Eindringen des Pathogens in die Pflanze soll verhindert und seine Ausbreitung auf einen möglichst kleinen Gewebebereich beschränkt werden. Darüber hinaus wird die Verfügbarkeit von pflanzlichen Nährstoffen eingeschränkt.

Eine Pflanze hat passive und aktive Abwehrmechanismen entwickelt, um sich gegen Pathogene zu schützen. Zunächst gibt es strukturelle Barrieren (Martin, 1964). Durch eine Verdickung der Cuticula, der äußersten wachsartigen Schutzschicht auf der Epidermis, wird das Eindringen des Phytopathogens erschwert. Weiterhin werden wasserabweisendes Lignin, Kallose, hydroxyprolinreiche Glykoproteine und Extensine zur Erhöhung der mechanischen Festigkeit in die pflanzliche Zellwand eingelagert. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) erhöht den Effekt der oxidativen Quervernetzung zur verbesserten strukturellen Stärke der Zellwand und schützt somit die Gewebezellen vor einer Degradation durch Pathogene (Torres *et al.*, 2006). Lignin bildet in Kombination mit Kallose (Polymer von β -1,3-Glucan; Stone und

Clarke, 1992) so genannte Papillen (Aist, 1976). Es handelt sich hierbei um Erhebungen der pflanzlichen Oberfläche, welche auch als Warzen bezeichnet werden. Es wird vermutet, dass diese Zellwandverdickungen eine physikalische Barriere gegenüber dem Pathogen darstellen und dessen Wachstum entgegenwirken (Underwood und Sommerville, 2008). Darüber hinaus gibt es Gefäßverschlüsse in Form von Gelen oder eine vermehrte Haarbildung zum Schutz vor der Kolonisierung eines Pathogens. Biochemische Barrieren sind die Bildung von Phytoalexinen und antimikrobiellen Proteinen (AMPs). Als Phytoalexine sind Phenole, Terpenoide und Fettsäurederivate bekannt (Dixon, 2001). Sie werden überwiegend nach einer Pilzinfektion in der Pflanze gebildet (Pedras *et al.*, 2000). Diese Substanzen wirken z. B. toxisch oder abschreckend als Fraßschutz auf die Phytopathogene und stammen aus dem Sekundärstoffwechsel der Pflanze. Phytoalexine gehen aus dem allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel der Pflanzen hervor, in dem das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) als Schlüsselenzym fungiert (Hahlbrock und Scheel, 1989). AMPs können z. B. Chitinasen (Legrand *et al.*, 1987) oder β -1,3-Glukanasen sein (Kauffmann *et al.*, 1987), welche Substanzen aus der pilzlichen Zellwand enzymatisch angreifen können und den Pilz somit schädigen und abwehren.

1.2. Aktuelle Modelle der Pflanze Pathogen Interaktion

Die Pflanze erkennt so genannte PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), MAMPs (*mitogen associated molecular patterns*) oder DAMPs (*damage associated molecular patterns*) über Rezeptoren (Abbildung 2). Eine Definition von Schwessinger und Zipfel (2008) besagt, dass es sich bei PAMPs/MAMPs um invariante Epitope von essentiellen Molekülen des Pathogens handelt, welche fundamental für das Überleben des Pathogens sind, dazu weit verbreitet unter verschiedenen Pathogenspezies und in einem breiten potentiellen Wirtsspektrum wahrnehmbar sind.

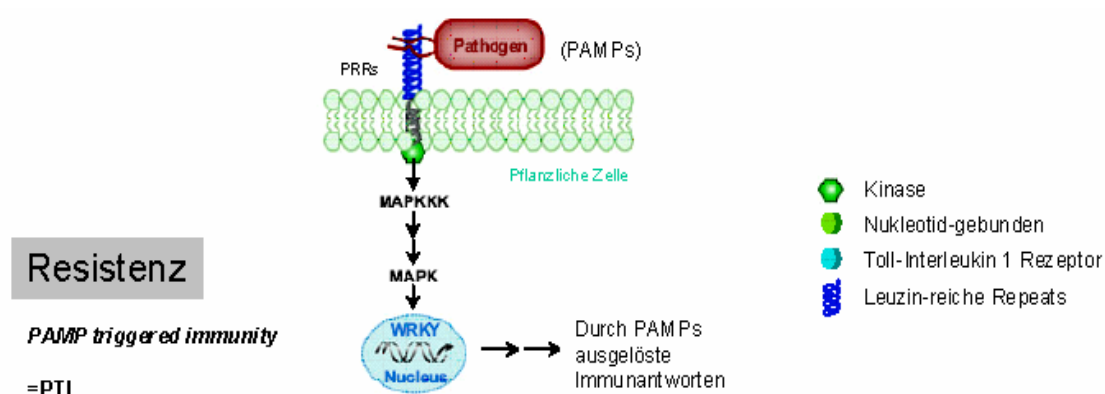


Abbildung 2: Übersicht der PTI (*PAMP triggered immunity*). Die pflanzlichen Rezeptoren (PRRs) erkennen an der Zelloberfläche die PAMPs und sorgen für eine Signalweiterleitung, z. B. über Phosphorylierungen von Kinasen, in den Kern. Dort werden Zielgene exprimiert, welche eine Immunantwort einleiten. Die Pflanze erkennt das Pathogen und ist resistent. Abbildung verändert nach Bent und Mackey (2007).

Die pflanzlichen Rezeptoren werden als PRRs (*transmembrane pattern recognition receptors*) bezeichnet und befinden sich an der Zelloberfläche (Zipfel, 2008). Die PRRs sind *receptor like kinases* (RLKs) oder *receptor like proteins* (RLPs) und charakterisieren die Wahrnehmung eines Pathogens sowie die Signalweiterleitung in das Innere der Zelle (Altenbach und Robatzek, 2007). Im *Arabidopsis* Genom gibt es über 600 RLKs und mehr als 50 RLPs (Shiu und Blecker, 2003; Fritz-Laylin *et al.*, 2005). Den größten Anteil bilden Transmembranproteine oder sekretierte Proteine (Zipfel, 2008).

Die Rezeptoren agieren nicht alleine. Ein bekanntes Beispiel ist der Brassinosteroidrezeptor BRI1 (*brassinosteroid insensitive 1*), welcher durch Perzeption des Phytohormones Brassinosteroid der Pflanze Regulation bei Wachstum und Entwicklung vermittelt. Eine BRI1-assoziierte Kinase 1 (BAK1) ist für die exakte Wahrnehmung des Liganden zusätzlich notwendig. Zudem wurde BAK1 als positiver Regulator bei FLS2 (Rezeptor von Flagellin) und EFR (Rezeptor des EF-Tu) identifiziert (Chinchilla *et al.*, 2007). BAK1 wird als zentraler Regulator bei verschiedenen PRRs in der Immunantwort der Pflanze postuliert (Heese *et al.*, 2007).

PAMPs können komplexe Kohlenhydrate von pilzlichen Zellwänden, mikrobielle Enzyme, Polypeptide, Proteine oder Lipide sein, welche Abwehrreaktionen in Pflanzen hervorrufen können. Verschiedenen PAMPs

sind z. B. Chitin, Flagellin, Elongationsfaktor Tu, Lipopolysaccharid oder HarpinZ (Nürnberger *et al.*, 2004). PAMPs sind variabler als früher erwartet. Das bedeutet, dass verschiedene Pflanzenspezies verschiedene Epitope von Pathogenen erkennen. Die PAMP-Variabilität wird durch die Vielfältigkeit der korrespondierenden PRRs erklärt (Schwessinger und Zipfel, 2008). Früher wurden PAMPs auch als Elicitoren (lat. *elicere* = hervorlocken) bezeichnet. Es gibt auch endogene Elicitoren. Endogene Elicitoren sind z. B. Oligosaccharidfragmente, welche aus der pflanzlichen Zellwand stammen (Ryan *et al.*, 2007). Ein Beispiel für einen endogenen Peptid-Elicitor aus *Arabidopsis* ist AtPep1 (Huffaker *et al.*, 2006).

Die basale Abwehr nach der Wahrnehmung eines PAMPs (Chisholm *et al.*, 2006) wird als PTI (*PAMP triggered immunity*) bezeichnet (Abbildung 2, Seite 5). Als weitere Reaktionen der PTI sind MAPK(*mitogen activated protein kinase*)-Kaskaden mit Protein-Phosphorylierungen als Reaktion bekannt (Jones und Dangl, 2006; Nürnberger und Kemmerling, 2006). Dabei wird eine Signaltransduktion über so genannte MAPK, MAPKK oder MAPKKK ausgelöst (Mishra *et al.*, 2006). Eine schnelle und transiente Phosphorylierung von spezifischen nuklearen, cytosolischen und Membran-gebundenen Proteinen wird somit durch die PAMP-Erkennung bewirkt (Felix *et al.*, 1991; Peck, 2003). In *Arabidopsis* wurden 20 MAPK, 10 MAPKK und 60 MAPKKK vorhergesagt (Zhang *et al.*, 2006). Infolge der Signaltransduktionskaskaden kommt es zu einer gesteigerten Expression von PR(*pathogenesis related*)-Genen, welche z. B. für Chitinasen kodieren (van Loon *et al.*, 2006). Bislang konnten verschiedene Klassen von PR-Proteinen entsprechend ihrer Funktion, ihrer Aminosäuresequenz, ihrer serologischen Eigenschaften und des Molekulargewichts klassifiziert werden.

Die PTI umschließt ein Anstieg an Ca^{2+} -Ionen, die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wie Superoxidanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Stickstoffmonoxid (NO) (Delledonne *et al.*, 1998; Neill *et al.*, 2002; Apel und Hirt, 2004; Quan *et al.*, 2008). Der Prozess wird auch als *oxidative burst* bezeichnet (Bolwell *et al.*, 2002). Die ROS werden von membranständigen NADPH-Oxidasen und/oder apoplastischen Peroxidasen

gebildet (Bindschedler *et al.*, 2006). Sie wirken toxisch auf die Pathogene und/oder bewirken eine oxidative Quervernetzung der Zellwand. Das Protein *Non-Expressor of Pathogenesis-Related Genes 1* (NPR1) ist im Cytoplasma vorhanden. Im Falle von veränderten Redoxstadien in der Zelle nach einem Pathogenbefall verändert sich das Protein vom Disulfid-gebundenen Oligomer zu einem aktiven Monomer und wandert in den Kern (Kinkema *et al.*, 2000). Dort interagiert es mit Mitgliedern der TGA-Transkriptionsfaktorfamilie, einer Klasse von basischen Leuzin-Zipper Proteinen (Pieterse und van Loon, 2004), und führt zu einer gesteigerten spezifischen Genexpression. Außerdem zeigen sich als Immunantwort Rezeptor-Endozytosen (Robatzek *et al.*, 2006) und Protein-Protein-Interaktionen. Bei der PTI handelt es sich um eine sehr schnelle Abwehrreaktion, die innerhalb von 10min in Kraft tritt (Abramovitch *et al.*, 2006).

Lokale Abwehrreaktionen können auch durch mechanische Verwundung und die Behandlung mit synthetischen PAMPs, wie z. B. Flg22 oder Pep13/25 induziert werden (Nürnberger *et al.*, 1994; Rushton *et al.*, 1996; Felix *et al.*, 1999; Brunner *et al.*, 2002). Pep13/25 sind interne Peptidfragmente eines Glykoproteins (42 kDA), welches für eine Kalzium-abhängige Transglutaminase kodiert. Sie wurden aus der Zellwand von *Phytophthora megasperma f.sp. glycinea* (Pep13; Nürnberger *et al.*, 1994) bzw. *Phytophthora sojae* (Pep25; Rushton *et al.*, 1996) isoliert und sind in vielen anderen *Phytophthora*-Arten vertreten. Gut untersucht ist die Wahrnehmung des Flg22 (Felix *et al.*, 1999), ein N-terminales Peptid des bakteriellen Flagellins durch den FLS2-Rezeptor in *Arabidopsis* (Gomez-Gomez und Boller, 2000; Chinchilla *et al.*, 2006) und die dadurch vermittelte Aktivierung von zwei spezifischen Transkriptionsfaktoren (Asai *et al.*, 2002).

Eine große Rolle bei der Immunantwort spielen die Transkriptionsfaktoren der WRKY-Familie (Eulgem und Somsich, 2007). Viele WRKY-Gene zeigen nach einer Pathogeninfektion oder Behandlung mit einem PAMP erhöhte Transkriptlevel in der Pflanze (Dong *et al.*, 2003). Einige der 72 WRKY-Gene werden vermutlich durch Autoregulation oder durch andere WRKYs kontrolliert (Robatzek und Somssich, 2002; Dong *et al.*, 2003). Viele Promotoren von

Pathogen-induzierten WRKY-Genen zeigen eine Anreicherung von W-Boxen (Eulgem, 2006). W-Boxen sind *cis*-regulatorische Elemente, Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren, und somit für die Kontrolle der Genexpression notwendig. WRKY-Faktoren wirken sowohl als positive als auch als negative Regulatoren bei der Genexpression im Zuge der Pathogenabwehr (Eulgem und Somssisch, 2007).

Einige Pathogene übertragen Effektorproteine in die Pflanzenzelle, diese werden dann als Virulenzfaktoren (z. B. VirPphA) bezeichnet (Abbildung 3).

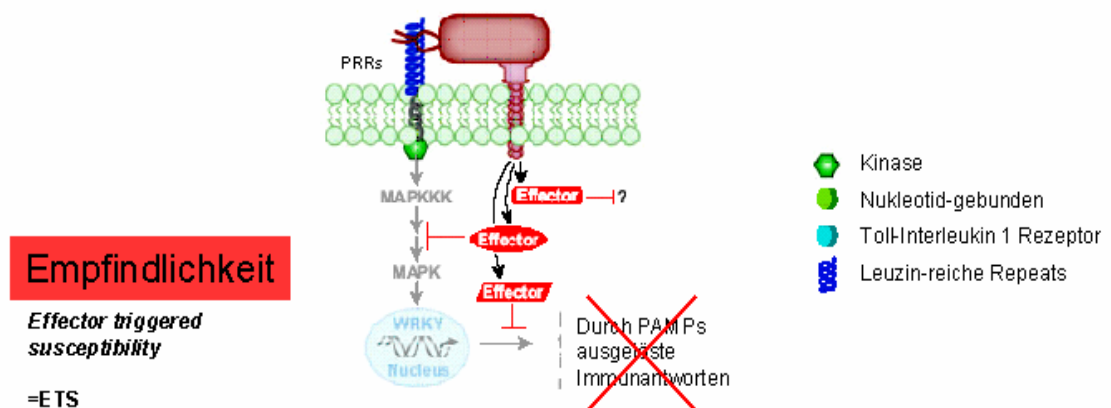


Abbildung 3: Übersicht der ETS (*Effector triggered susceptibility*). Phytopathogene z. B. Bakterien übertragen über ein TypIII-Sekretionssystem Effektoren in die pflanzliche Zelle. Diese sorgen entweder dafür, dass die Gefahr-Signalweiterleitung der Pflanze unterbunden wird oder sie reprimieren die Expression von pflanzlichen Abwehrproteinen. In Folge kommt es zu keiner Immunantwort und die Pflanze ist empfindlich gegenüber dem Pathogen. Abbildung verändert nach Bent und Mackey (2007).

Eine Abwehrreaktion der Pflanzen wird unterbunden, da die Pflanze diese Effektoren nicht wahrnehmen kann. Man spricht von einer ETS (*effector triggered susceptibility*), einer Empfindlichkeit der Pflanze gegenüber dem Pathogen (Chisholm *et al.*, 2006). Effektoren können Toxine, imitierte Pflanzenhormone oder Exopolysaccharide sein (Abramovitch *et al.*, 2006). Letztere fördern die Koloniebildung und Fortbewegung des Pathogens. Infolge der ETS kommt es zum Zelltod (*disease associated cell death*), welcher durch Chlorosen und Nekrosen sichtbar wird. Das Pflanzengewebe stirbt an der Infektionsstelle ab und das Pathogen vermehrt sich. Die Effektoren werden bei Bakterien über ein TypIII-Sekretionssystem in die Pflanze überführt

(Abramovitch *et al.*, 2006; Dangl und McDowell, 2006). Bei der kompatiblen Interaktion kann sich das Pathogen (virulent) auf bzw. in der Wirtspflanze vermehren. Nur wenige Krankheitserreger besitzen Mechanismen, die zu einer kompatiblen Interaktion mit bestimmten Pflanzen, d.h. zur Entstehung der Krankheit führen (Abbildung 3).

Die Gen-für-Gen-Hypothese von Flor (1971) beim Pathosystem Flachs (*Linum usatissimum*) und Flachsrost (*Melampsora lini*) besagt, dass der Ausgang einer Wirt/Pathogen-Interaktion durch ein Paar komplementärer Genprodukte bestimmt wird: einem Resistenzgen (R-Gen) im Wirt und einem Avirulenzgen (Avr-Gen) im Pathogen (Abbildung 4). Es handelt sich um eine sehr schnelle Abwehrantwort, welche zudem eine hohe Spezifität besitzt. Diese Reaktion wird als ETI (*effector triggered immunity*) bezeichnet (Abbildung 4).

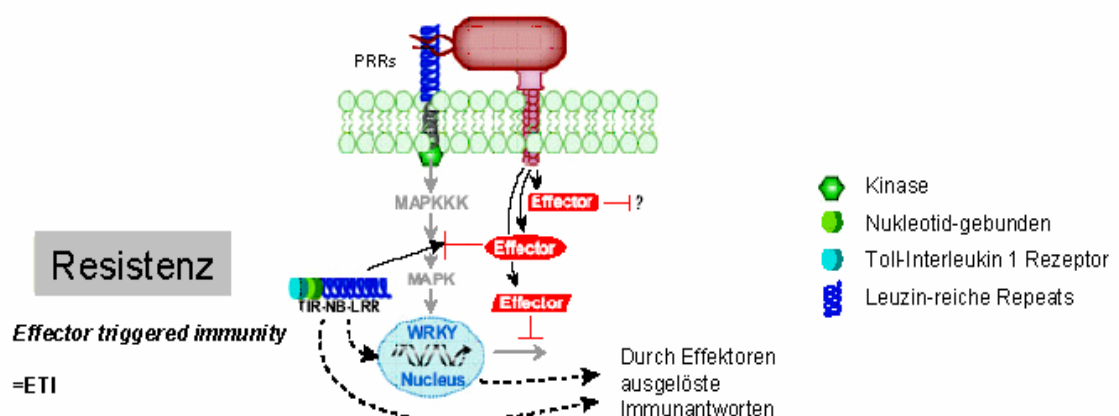


Abbildung 4: Übersicht der ETI (*Effector triggered immunity*). Phytopathogene z. B. Bakterien übertragen über ein TyplII-Sekretionssystem Effektoren in die pflanzliche Zelle. Besitzt die Pflanze ein komplementäres Erkennungssystem, so kann der Effektor detektiert werden und eine Immunantwort wird ausgelöst. Abbildung verändert nach Bent und Mackey (2007).

Eine Wirtspflanze ist nur dann resistent, wenn sie von einem Pathogen infiziert wird, welches das komplementäre Avirulenzgen trägt (inkompatible Interaktion). R-Gene bewirken Resistenz gegenüber Bakterien, Pilzen, Viren, Nematoden und Insekten (Martin *et al.*, 2003). Bislang wurden circa 40 R-Gene kloniert (Martin *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass sich die R-Proteine vorwiegend im Cytoplasma, aber auch in der Zellmembran befinden (Schulze-Leffert und Vogel, 2000). Die Genprodukte der R-Gene werden in 5 Klassen

unterteilt und allgemein als *Nucleotide binding site-Leucine rich repeat proteins* (NBS-LRR) bezeichnet (Martin *et al.*, 2003). Die Bezeichnung resultiert aus einer Nukleotid-Bindungsstelle und einer Wiederholung von Leuzin-haltigen Motiven. Zu den Klassen gehören die TIR(*Toll-like/Interleukin-like-receptors*)-NBS-LRR, die LZ(*leucine-zipper*)-NBS-LRR und die CC(*coiled-coiled*)-NBS-LRR. Die beiden übrigen Klassen sind zum einen Proteine, welche Serin/Threonin-Kinasedomänen besitzen, zum anderen Proteine mit einer Transmembrandomäne. Es gibt über 200 LRR-Kinasen im *Arabidopsis Col-0* Genom (Shiu und Bleeker, 2001). Viele R-Proteine sind im Cytoplasma lokalisiert und nehmen demnach im Inneren der Zelle die Effektoren wahr. Zudem zeigen die Rezeptoren strukturelle Ähnlichkeiten zu den tierischen Nukleotid-bindenden und Oligomerisationsdomänen (NOD)-ähnlichen Rezeptoren (Dangl und Jones, 2001; Fritz *et al.*, 2006).

Die Pathogene steuern der Erkennung im Wirt entgegen, indem sie neue Effektoren durch horizontalen Gentransfer erhalten (Ma *et al.*, 2006) oder durch Strukturveränderung des Effektors (Wang *et al.*, 2007), so dass in beiden Fällen der Effektor nicht als „Gefahr“ von der Pflanze wahrgenommen werden kann. Pathogene besitzen also die Möglichkeit Effektoren zu verändern oder zu eliminieren (Abbildung 5). Demzufolge kommt es erneut zu einer ETS (*effector triggered susceptibility*).

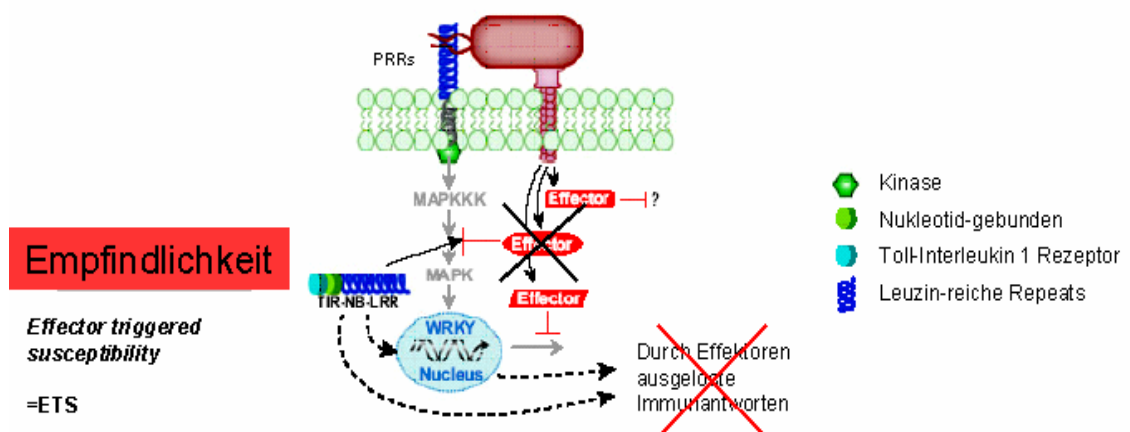


Abbildung 5: Übersicht der ETS (*Effector triggered susceptibility*). Phytopathogene z. B. Bakterien übertragen über ein TypIII-Sekretionssystem Effektoren in die pflanzliche Zelle. Bakterien können über horizontalen Gentransfer neue Effektoren erhalten, welche die Pflanze nicht erkennt, wenn sie nicht das komplementäre Erkennungssystem besitzt. Demzufolge kommt es zu keiner Immunantwort gegen das Pathogen und die Pflanze ist empfindlich. Abbildung verändert nach Bent und Mackey (2007).

Im Gegenzug besitzen Pflanzen, wie oben beschrieben, eine große Anzahl an NBS-LRR-Genen, die relativ schnell neue Spezifitäten vermitteln können. Das ermöglicht eine *Birth-and-Death* Evolution dieser Gene und Pflanzen können neue Rezeptoren zur Erkennung neuer Effektoren entwickeln (Nei und Rooney, 2005). Die NBS-LRR-Gene sind zudem in Clustern organisiert.

1.3. Die Rolle von Signalmolekülen und Phytohormonen bei der Pathogenabwehr

Bei der lokalen hypersensitiven Reaktion (HR) und der ETI spielen verschiedene Signalsubstanzen eine Rolle. Die unterschiedlichen Abwehrprozesse, induziert durch verschiedene Signalmoleküle, basieren auf der Art der pathogenen Pilze. Die Salizylsäure (SA) vermittelt hauptsächlich eine Resistenz gegenüber biotrophen Pilzen (Ernährung von lebendem Gewebe, z. B. *Peronospora parasitica*). Diese Abwehrreaktion wird durch die gesteigerte Expression der Markergene PR-1, PR-2 und PR-5 begleitet. Die Jasmonsäure (JA) und das Ethylen stellen synergistisch die Resistenz gegenüber nekrotrophen Pilzen (Ernährung von totem Pflanzengewebe; z. B. *Botrytis cinerea*) dar. Als Markergen wurde das PDF1.2 (*Plant Defensin*) identifiziert. Man bezeichnet das Zusammen- und Entgegenwirken von pflanzlichen Signalsubstanzen auch als *cross-talk* (Spoel *et al.*, 2007). Die Abbildung 6 fasst diese Merkmale gegenüber der pilzlichen Abwehr zusammen.

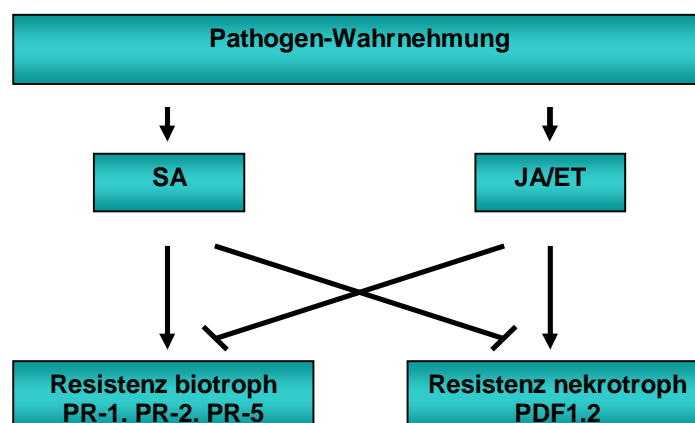


Abbildung 6: Schema der biotrophen und nekrotrophen Resistenz (verändert nach Thatcher *et al.*, 2005).

Die Rolle von Jasmonsäure ist Fruchtreife, Fertilität, Wurzelwachstum, Wundantwort, Antwort auf Insektenbefall (sowie andere Herbivoren) und mikrobielle Angreifer als auch auf abiotischen Stress (Turner *et al.*, 2002). Die JA-Signaltransduktion ist unabhängig von erhöhten SA-Leveln (Petersen *et al.*, 2000) und wird vermutlich durch die schnelle Degradierung einer Klasse von Repressorproteinen vermittelt. Diese Proteine sind die JAZ(*jasmonate ZIM-domain*)-Proteine. Sie binden an das F-Box-Protein COI1 SCF (*Skip/Cullin/F-box*), welches dem E3 Ubiquitin Ligase Komplex angehört (Thines *et al.*, 2007). Die JAZ-Proteine sind somit in der spezifischen Ubiquitinilierung und Degradierung von Proteinen im 26S Proteasom beteiligt (Staswick, 2008). Die JAZ-Proteine scheinen die Transkription von Jasmonat-responsiven Genen zu reprimieren. Die JAZ-Transkripte selbst sind durch JA induzierbar. Chini *et al.* (2007) zeigten eine negative *Feedback* Regulation zwischen dem JA-responsiven MYC2 Transkriptionsfaktor und JAZ3. Die MAPK 4 wird als ein negativer Regulator des SA-Signalling vermutet. Da die Kinase zudem für die Induktion von JA-Abwehrgenen notwendig ist, wird weiter angenommen, dass dieses Enzym eine Schlüsselfigur in der Vermittlung des Antagonismus zwischen JA/SA-Signalling innehat (Petersen *et al.*, 2000; Brodersen *et al.*, 2006).

Das Phytohormon Ethylen ist in Wachstum und Entwicklung der Pflanze wie Keimlingsentwicklung, Blatt- und Fruchtseneszenz, Fruchtreife und Blattabtrennung involviert (Abeles *et al.*, 1992). Ethylen ist als Regulator sowohl bei abiotischen als auch biotischen Stress bekannt (Wang *et al.*, 2002). Eine erhöhte Ethylenproduktion in der Pflanze ist eine sehr schnelle Antwort auf einen Pathogenbefall der Pflanze (Boller, 1991). Generell lässt sich sagen, dass Ethylen in verschiedenen Pflanzenspezies Abwehrantworten stimulieren oder reprimieren kann (Lawton *et al.*, 1994; Ohtsubo *et al.*, 1999). Bei der hypersensitiven Reaktion (HR) werden große Mengen an Ethylen am Ort der Infektion und Nekrosenbildung in der Pflanze freigesetzt. Die transkriptionelle Regulation der Ethylenwahrnehmung wird über Ethylen-responsive Transkriptionsfaktoren (ERFs) vollzogen, welche an *cis*-Elemente binden, die eine GCC-Kernsequenz (GCC-Box) aufweisen (Ohme-Takagi *et al.*, 2000). ERF1 aus *Arabidopsis* reguliert diverse Ethylen-induzierbare Gene

(Solano *et al.*, 1998). Die Genexpression der ERFs wird differentiell durch biotischen sowie abiotischen Stress (Trockenheit, Salzstress, Kälte) reguliert (Fujimoto *et al.*, 2000). Die Expression der einzelnen ERF-Gene wird durch Ethylen und abiotischen Stress ausgelöst (Fujimoto *et al.*, 2000). Daher wird vermutet, dass die ERFs Kontrollpunkte darstellen könnten, um die Expression der Stress-induzierten Gene durch Ethylen, JA und ABA zu integrieren. Die GCC-Box könnte für den Zusammenschluss von abiotischen und biotischen Stress das zentrale *cis*-Element darstellen. Die ERF-Familie an Transkriptionsfaktoren gehört zur AP2/ERF Superfamilie. In *Arabidopsis* sind 122 Mitgliedern an ERFs bekannt (Nakano *et al.*, 2006). Die meisten ERFs agieren als Aktivatoren (AtERF1, AtERF2 und AtERF5); es sind aber auch Repressoren (AtERF3 und AtERF4) bekannt (Fujimoto *et al.*, 2000).

Die SA- und JA/ET-Pathways verhalten sich antagonistisch (Abbildung 6, Seite 11; Glazebrook, 2005; Thatcher *et al.*, 2005; van Loon *et al.*, 2006). Zur Aufklärung dieser Signalwege haben zahlreiche *Arabidopsis*-Mutanten beigetragen (Thatcher *et al.*, 2005).

Weitere Phytohormone modifizieren die Signalbalance von SA, JA und Ethylen. So spricht die Induktion von Auxin-Biosynthesegenen durch biotrophe Pathogene und die Reprimierung der HR durch Auxin für eine potentielle Rolle eines Negativregulators des SA-Pathways (Abbildung 7, Seite 14). Cytokinin besitzt eine ähnliche Rolle (Abbildung 7, Seite 14). Es wird wie Auxin durch biotrophe Pathogene produziert und wird mit einer Suppression der HR assoziiert. Zudem wurde Cytokinin als Induzierer von Zelltod determiniert (Carimi *et al.*, 2003). Für beide Hormone gilt, dass die Antwort der Pflanze auf das Hormon von der Dosis abhängig ist. Gibberellinsäure (GA) hat offensichtlich den gegenständigen Effekt auf die Pflanzenabwehr. GA vermittelt Pflanzenwachstum, indem es die Degradierung von negativen Pflanzenwachstumsregulatoren (DELLA-Proteinen) induziert (Harberd, 2003). Es wird vermutet, dass DELLAs die Resistenz gegenüber biotrophen Pathogenen und die Empfindlichkeit gegenüber nekrotrophen Pathogenen vermitteln (Abbildung 7, Seite 14), indem sie die Balance zwischen der SA-vermittelten Abwehrreaktion und der JA/ET-vermittelten Abwehr modulieren

(Navarro *et al.*, 2008; Smirnov und Grant, 2008). Es wird postuliert, dass die ROS-Produktion durch DELLAs beeinflusst wird (Achard *et al.*, 2008). Feng *et al.* (2008) vermuten, dass DELLAs Genexpression indirekt über die Kontrolle von anderen Transkriptionsfaktoren (TFen) regulieren (z.B. PIF3). Abscisinsäure (ABA) besitzt eine große Rolle bei der Adaption und Reaktion auf abiotischen Stress (Abbildung 7, Seite 14). Zudem scheint dieses Pflanzenhormon ein negativer Regulator des SA-Pathways zu sein. Weiter wird postuliert, dass ABA die Pflanzenabwehr sowohl gegenüber biotrophen als auch gegenüber nekrotrophen Pathogenen negativ reguliert. Vielmehr erlaubt dieses Pflanzenhormon der Pflanze zwischen abiotischen und biotischen Stress zu unterscheiden (Mauch-Mani und Mauch, 2005). Brassinosteroide (BS) vermitteln eine erhöhte Resistenz gegenüber biotrophen Pathogenen (Nakashita *et al.*, 2003), jedoch scheint dieser Mechanismus unabhängig vom SA-Signalling zu sein (Abbildung 7).

Die aufgeführten Signalmoleküle und Phytohormone werden bei Robert-Seilantantz und Kollegen (2007) in ein Model integriert (Abbildung 7). Das Model beschreibt, dass Auxin und Cytokinin aktivierend (+) den JA/Ethylen Signalweg und somit eine nekrotrophe Resistenz vermitteln und Gibberellin bei dieser Resistenz reprimierend (-) wirkt. Brassinosteroide unterstützen unabhängig vom SA-Signalweg eine biotrophe Resistenz. Abscisinsäure ist hauptsächlich in die abiotische Stress Toleranz involviert.

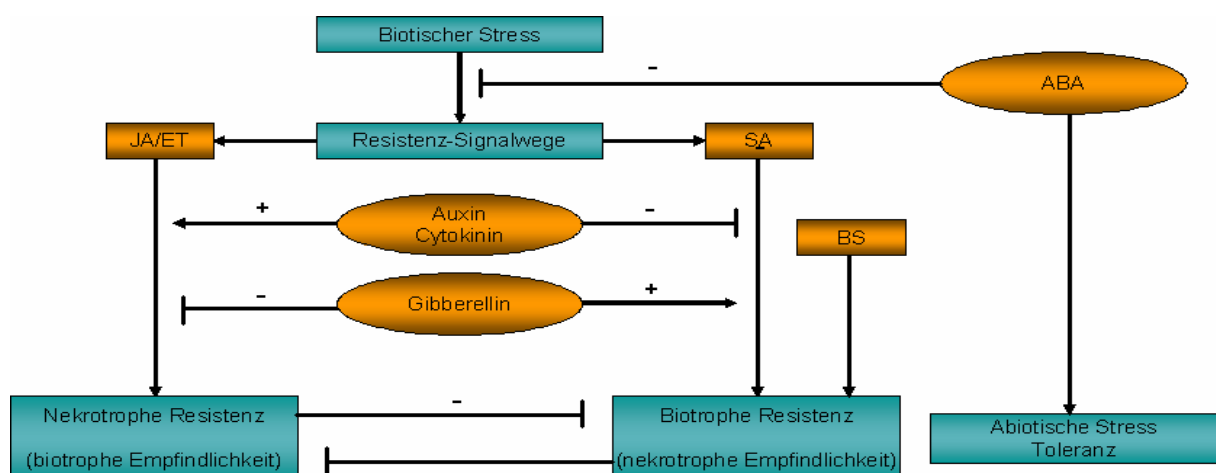


Abbildung 7: Darstellung der potentiellen Interaktionen von verschiedenen Phytohormonen in Bezug auf biotischen sowie abiotischen Stress (verändert nach Robert-Seilantantz *et al.*, 2007).

1.4. Die systemisch erworbene Resistenz

Pflanzen entwickeln eine erhöhte Resistenz gegenüber weiteren Infektionen durch pathogene Bakterien, Pilze, Viren und herbivore Insekten (Sticher *et al.*, 1997; Durrant und Dong, 2004). Diese unspezifische Resistenz mit ihrer langanhaltenden Wirkung (Wochen bis Monate) wird als systemisch erworbene Resistenz (*systemic acquired resistance*; SAR) bezeichnet (Durrant und Dong, 2004). Sie ist durch die koordinierte Expression mehrerer Gene im lokalen und systemischen Gewebe der Pflanze gekennzeichnet. Zu den Genprodukten dieser so genannten SAR-Gene gehören erneut PR-Proteine (Maleck *et al.*, 2000). Als Marker für die SAR gelten in *Arabidopsis* die Expression von PR-1, PR-2 und PR-5. Eine Akkumulation des Signalmoleküls SA ist ebenfalls ein Merkmal der SAR, sowohl am Infektionsort (lokal) als auch im systemischen Gewebe (Loake und Grant, 2007). Dieser Zusammenhang wurde durch transgene Pflanzen gezeigt, welche nicht in der Lage sind SA zu akkumulieren (*nahG*-Pflanzen), da durch die Expression des bakteriellen Salicylathydroxylasegens SA durch Umwandlung in Catechol inaktiviert wird und keine SAR-Antwort zu detektieren ist (Gaffney *et al.*, 1993). Eine Aktivierung von SAR zeigt sich ebenso durch exogen applizierte SA oder durch die biologisch aktiven Analoga INA (2,6-Dichlorisonikotinsäure) und BTH (Benzo(1, 2, 3)thiadiazole-7-carbothiosäure-S-Methylester) (Somssich, 2003; Zhu *et al.*, 2003). Ca^{2+} und Calmodulin spielen ebenfalls eine Rolle bei der SA-vermittelten SAR (Du *et al.*, 2009).

Das bereits erwähnte Protein NPR1 ist ein Schlüsselregulator der SAR und weiter für die Übermittlung des SA-Signals in den Kern zuständig (Pieterse und van Loon, 2004). NPR1 ist zudem für die SA-vermittelte Suppression der JA-responsiven Genexpression zuständig und somit ein Modulator der Kreuzvernetzung zwischen diesen beiden Signalmoleküle (Spoel *et al.*, 2003; Beckers und Spoel, 2005). Nach neuen Erkenntnissen moduliert Ethylen die Rolle von NPR1 in der Kreuzkommunikation von SA und JA (Leon-Reyes *et al.*, 2009). Pathogene haben Mechanismen entwickelt, die SA vermittelte SAR über ABA-Modulation und Coronatin-Produktion (Phytotoxin, Mimik von Jasmonsäure) zu umgehen (Loake und Grant, 2007).

Die volatilen Substanzen Methyl-Jasmonat (MJ) und Methyl-Salizylsäure sind diffundierbare Signalmoleküle zwischen Pflanzen und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Resistenz-Vermittlung (Heil und Ton, 2008). Dabei wird das vaskuläre Transportsystem von Substanzen durch ein Luftübertragungssystem ersetzt. Die unterschiedlichen Systeme können nebeneinander existieren und sind Dosis-abhängig von den entsprechenden Signalmolekülen.

1.5. Die Rolle der transkriptionellen Regulation bei der Pathogenabwehr

Im Zuge einer Pathogenabwehr werden verschiedene Gene reprimiert, andere Gene werden hochreguliert. Eine Regulation der Genexpression kann auf der Ebene der Transkription durchgeführt werden.

Die Initiation ist der erste Schritt der Transkription, bei der eine DNA-abhängige RNA-Polymerase eine RNA synthetisiert, deren Sequenz durch die DNA vorgeschrieben ist (Gill, 2001). Die Protein-kodierenden Gene werden bei Eukaryoten von der RNA-Polymerase II (RNA-Pol II) transkribiert (Abbildung 8). Dieses Protein assembliert mit mehr als 40 anderen Proteinen am Kernpromotor des jeweiligen Gens. Zusammen mit basalen Transkriptionsfaktoren (TFen) wird der Prä-Initiations-Komplex gebildet (Hampsey *et al.*, 1998). Bei der Regulation der Transkription durch Sequenz-spezifische Transkriptionsfaktoren (Repressoren oder Aktivatoren) findet eine Beeinflussung dieses Komplexes statt. Darüber hinaus interagieren so genannte Kofaktoren/Koregulatoren (Ko-Aktivatoren oder Ko-Repressoren) mit den spezifischen TFe und/oder mit einer Anzahl der basalen TFe. Diese Komponenten sind gemeinsam für die Regulation der Transkription verantwortlich (Martinez, 2002). Die Summe der Wechselwirkungen zwischen basalen und spezifischen TFe bewirkt eine verstärkte oder reprimierte Genexpression. Die spezifischen Transkriptionsfaktoren werden für *Arabidopsis* entsprechend ihrer konservierten Domänen in Transkriptionsfaktor-Familien eingeteilt (Riechmann *et al.*, 2000).

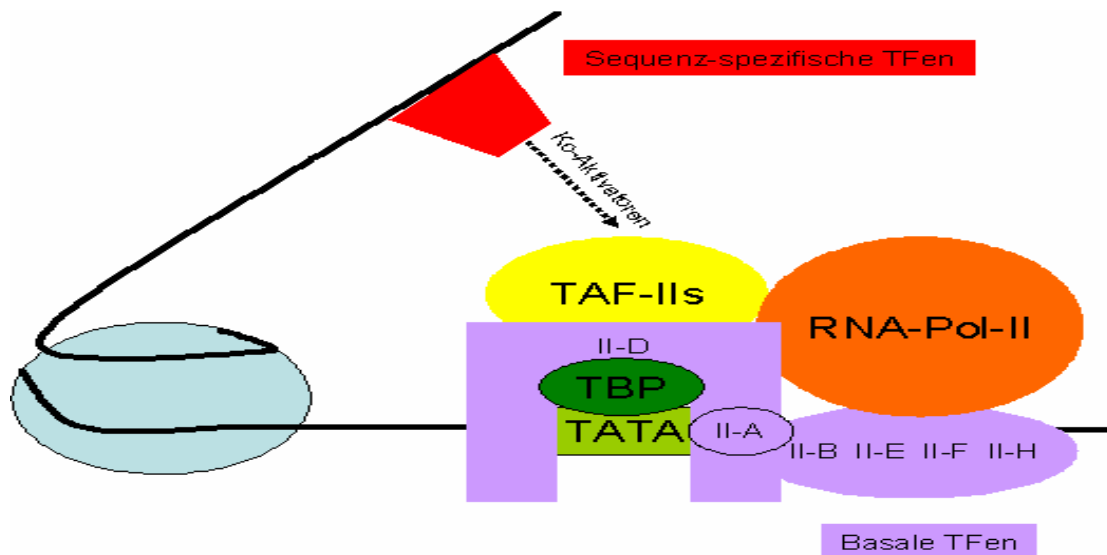


Abbildung 8: Darstellung der Transkriptionsinitiation (verändert nach http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor_2004/polIII_transcription.htm). Die DNA (schwarz) ist um Histone gewickelt (blau). Im Promotorbereich von eukaryotischen Genen befindet sich häufig eine TATA-Box, an welche das *TATA box binding protein* (TBP) bindet (grün). Zu den basalen Transkriptionsfaktoren (lila) gehört TFII-D, welcher an TBP bindet. Die TBP-assoziierten Faktoren (TAFs; gelb) sind weitere Bestandteile des TFII-D. Weitere generelle TFen (lila) stabilisieren diesen Komplex und rekrutieren die RNA-Polymerase II (orange) an den Promotor. Weiter können spezifische TFen (rot) auf die Initiation einwirken, meist über Ko-Aktivatoren.

Die generelle Transkriptionsmaschinerie (Abbildung 8) besteht aus der RNA-Polymerase II und sechs basalen TFen (TFII-A, TFII-B, TFII-D, TFII-E, TFII-F, und TFII-H). Die Polymerase selbst ist ein Enzym, welches aus vielen Untereinheiten besteht. Eigenständig kann die RNA-Polymerase II nicht den Promotor eines Gens erkennen und auch nicht die Transkription initiieren. Dabei agieren die basalen TFen, welche Kernpromotorelemente, wie z. B. die TATA-Box, erkennen. Bei den Eukaryoten bindet zuerst der so genannte TFII-D an die DNA. Der TFII-D besteht aus mehreren Komponenten. Das eine Element ist das *TATA box binding protein* (TBP), welches im Promotor die TATA-Box erkennt und daran bindet. Weitere Bestandteile des TFII-D sind die TBP-assoziierten Faktoren (TAF-IIs). Das TBP ist ein genereller Transkriptionsfaktor (Orphanides *et al.*, 1996). Nun bindet ein TFII-A an den Promotor, welcher TFII-D stabilisiert. Danach wird der TFII-B assoziiert, welcher den TBP-TATA Komplex stabilisiert und dafür sorgt, dass die RNA-Polymerase II gebunden werden kann. Der TFII-F führt die Polymerase II zum Promotor. Hinzu kommen TFII-E, der die Rekrutierung des TFII-H ermöglicht und dessen Aktivität stimuliert. Der TFII-H besitzt eine Helikase- sowie eine

Protein-Kinase-Aktivität. Die Helikase entwindet den DNA-Strang kurz vor und in der Polymerase. Die Kinase phosphoryliert die Carboxy-terminale Domäne (CTD) der Polymerase und vervollständigt den Start der Transkription. Der finale Prä-Initiations-Komplex ist ein großer Nukleo-Protein-Komplex, welcher aus 43 Proteinen besteht. Nach Beginn der Transkription werden Nukleotide unter Spaltung von Pyrophosphat in die entstehende mRNA eingefügt. Nach dem Einbau von ca. 12 Nukleotiden bewegt sich die Polymerase von der Stelle, wobei der Initiationskomplex zerfällt.

Es gibt auch Gene, welche im Promotor keine TATA-Box aufweisen. Diese Promotoren enthalten im Bereich des Transkriptionsstarts ein Initiations-Element (Inr). An diesen Bereich bindet der TFII-I und interagiert mit TFII-D (Roy *et al.*, 1993). Dadurch wird der basale Initiations-Komplex ausgebildet, die weiteren Faktoren können binden und die Polymerase wird rekrutiert. Demzufolge zeigen TATA-Box und Inr-Element eine ähnliche Funktion.

Ziel bei der Transkriptionsaktivierung von proteinkodierenden Genen ist es, die Bindung von basalen Transkriptionsfaktoren zu begünstigen und die RNA-Polymerase II zu rekrutieren. Die Genexpression wird durch die Bindung von spezifischen Transkriptionsfaktoren an Promotor-Elemente reguliert (Reményi *et al.*, 2004). In Bezug auf die Pathogenabwehr gibt es spezifische TFen, welche der Pflanze je nach Stimulus eine gesteigerte Genexpression von Zielgenen vermitteln und der Pflanze somit eine gezielte Abwehrreaktion ermöglichen. Ein Beispiel für einen spezifischen Transkriptionsfaktor (TF) ist WRKY70 (Li *et al.*, 2004). Er agiert als Aktivator bei der SA-vermittelten Antwort auf biotrophe Pilze. Außerdem besitzt der TF eine Rolle bei JA-induzierbaren Genen, die bei Abwehr eines nekrotrophen Pilzes hochreguliert werden (Li *et al.*, 2004).

Um die Interaktion zwischen Pflanzen und verschiedenen Pathogenen im großen Maßstab auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, kann die Microarraytechnologie verwendet werden. Hierbei kann eine große Anzahl von hochregulierten Transkripten, welche durch die Pathogen- oder Signalmolekülbehandlung in der Modellpflanze *Arabidopsis* induziert werden, mithilfe von Genchips analysiert werden.

1.6. Die Transkriptomanalyse bei der Pflanze Pathogen Interaktion

Im Jahr 2000 wurde das gesamte Genom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* sequenziert (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Infolgedessen ist es möglich, einen Großteil der zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimierten Gene in Form von Transkripten zu detektieren und zu identifizieren. Über das so ermittelte Transkriptom kann eine Aussage über den jeweiligen Zustand der Pflanze getroffen werden. Die Methode, die hierbei verwendet wird, bezeichnet man als Biochip-Technologie. Biochips sind in der biologischen und medizinischen Grundlagenforschung weit verbreitet. Die Vorteile liegen in der Miniaturisierung, Automation und Parallelisierung von Analyseschritten. Mit einem hohen Durchsatz an parallel messbaren Parametern werden die Reproduzierbarkeit und die Qualitätssicherung zunehmend erhöht. Mit Biochips kann molekularbiologisch die Genexpression untersucht und quantifiziert werden. Die Technologie zielt darauf ab mit Hilfe von Sonden Informationen über Zellen, Gewebe oder eine ganze Pflanze zu erhalten. Sie basiert allgemein auf immobilisierten Nukleinsäuren (z.B. cDNA) auf einer Trägermembran (Glas, Metall, Nylon oder Nitrocellulosemembran). Mittels Hybridisierung von markierten, in cDNA umgeschriebenen mRNA-Molekülen aus z. B. uninfizierten (unbehandelten) bzw. infizierten Pflanzen kann die Genexpression einzelner Gene identifiziert werden und es wird ein Abbild des gegenwärtigen Transkriptoms mit Hilfe von verschiedenen Auswertungsprogrammen erstellt. Aufgrund der systematischen Anordnung der Sonden auf dem Trägermaterial wie in einem Raster werden Biochips auch als Arrays bezeichnet.

Das Transkriptom einer Pflanze verändert sich, je nachdem welcher Stimulus (z. B. eine Pathogeninfektion) bei einem Experiment verwendet wird. Die Pflanze reagiert während der Interaktion mit dem Pathogen und die Genexpression verändert sich. Mit Hilfe der Ergebnisse der Chiptechnologie können eine große Anzahl an Transkripten bei verschiedenen Stimulibehandlungen miteinander verglichen werden. Es können koregulierte Gene identifiziert werden, die bei verschiedenen pathogenen Stimuli gemeinsam hochreguliert bzw. reprimiert sind.

1.7. Microarrays für die Analyse der Pflanze Pathogen Interaktion

1.7.1. cDNA-Microarray

Für die Analyse von Transkriptomdaten während einer Pflanze Pathogen Interaktion können cDNA-Microarrays verwendet werden. Die cDNA-Microarrays basieren auf ca. 100 Nukleotide langen, immobilisierten Sonden. Diese Arrays können vom Experimentator selber hergestellt werden oder bei einem kommerziellen Hersteller bestellt werden. Die cDNA und somit auch die nachzuweisenden Gene (<10.000) werden mittels PCR als zukünftige Sonden produziert (Abbildung 9).

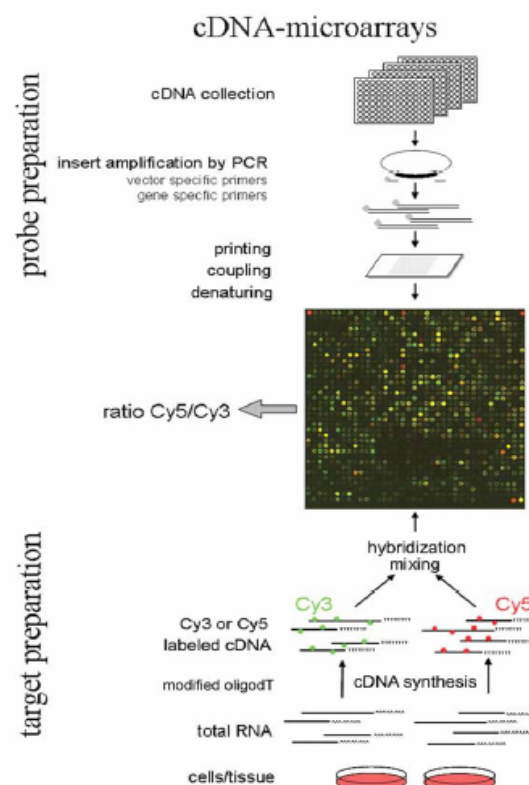


Abbildung 9: Ablauf eines cDNA-Microarrays (http://www.dkfz.de/ibios_old/lectures/bioinf_ss05/rkoenig/FunktionaleAnalyse1TB.pdf). Die mRNA zweier verschiedener Proben (infizierte/nicht-infizierte Pflanze) wird in cDNA umgeschrieben und unterschiedlich Fluoreszenz-markiert. Für die Sonden werden cDNAs mittels PCR vervielfältigt und auf eine Trägermembran aufgebracht. Nach Hybridisierung der Proben mit den Sonden kann über die Fluoreszenzmarkierung eine Detektion des Signals und somit des vorhandenen Transkriptes unterschiedlicher Gene erfolgen, je nachdem wo auf dem Trägermaterial die entsprechenden Sonden aufgebracht wurden.

Die hergestellte cDNA wird gereinigt und auf die Trägermembran als so genannte Spots aufgebracht. Der weitere Verlauf sieht vor, dass die mRNA aus uninfizierten Pflanzen in cDNA umgeschrieben wird (Abbildung 9). Dabei erhält sie eine Fluoreszenz-Markierung (grün). Die mRNA aus infizierten Pflanzen wird ebenfalls in cDNA umgeschrieben und erhält dabei eine andere Fluoreszenz-Markierung (rot). Diese beiden cDNA-Ansätze werden nun gleichzeitig mit dem Array hybridisiert. Die Signaldetektion erfolgt über die unterschiedlich markierten Fluoreszenzfarbstoffe. Mit Hilfe von öffentlicher oder selbstgeschriebener Software kann ein Quotient von einem roten Signal zu einem grünen Signal gebildet werden. Er gibt an, ob das entsprechende Gen an Position x auf dem Chip hoch- oder herunterreguliert wurde. Die Nachteile der cDNA-Arrays liegen in der geringeren Anzahl nachzuweisender Transkripte, da die Spotgröße deutlich größer ist als bei kommerziellen Chips. Auch zeigt sich eine geringere Reproduzierbarkeit und Spezifität der cDNA-Chips.

1.7.2. Oligonukleotid-Microarray

Um die veränderten Transkriptgehalte in einer Pflanze nach einem Pathogenangriff zu untersuchen, können auch Oligonukleotid-Microarrays verwendet werden. Bei diesen Arrays handelt es sich um ein kommerzielles Verfahren der Firma Affymetrix®. Diese vertreibt neben den vorgefertigten Chips für den Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (ATH1 Chip) auch die erforderlichen Geräte zur Detektion und die Software zur Auswertung der Signaldaten. Anders als bei vielen cDNA-Arrays wird bei der Affymetrix-Technologie pro Array nur eine Probe (*target*) hybridisiert, das bedeutet dass für die mRNA der Kontrollpflanze (nicht infizierte Pflanze) und die experimentelle mRNA (infizierte Pflanze) jeweils ein Chip hybridisiert wird (Abbildung 10).

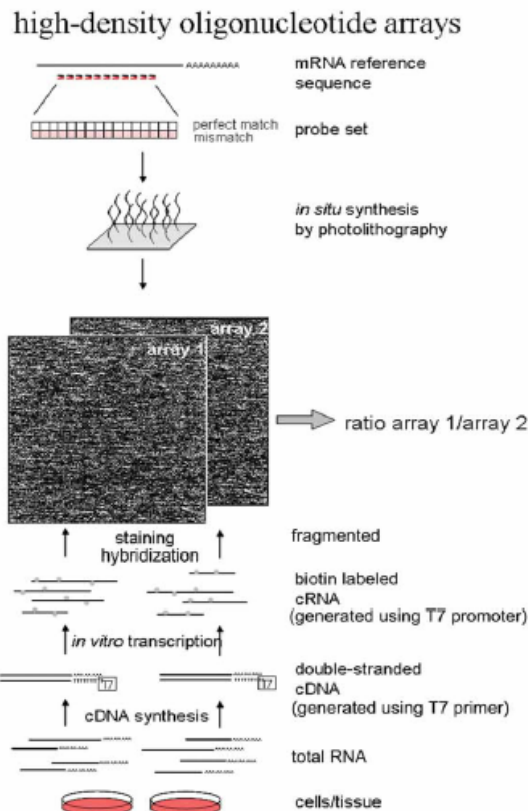


Abbildung 10: Ablauf eines Oligonukleotid-Microarrays (http://www.dkfz.de/ibios_old/lectures/bioinf_ss05/rkoenig/FunktionaleAnalyse1TB.pdf). Die mRNA zweier unterschiedlicher Proben (infizierte/nicht-infizierte Pflanze) wird in cDNA umgeschrieben und dabei wird eine T7-Promotorsequenz eingeführt. Mit Hilfe dieser Sequenz und einer T7-RNA Polymerase wird biotinylierte Antisense-cRNA gebildet. Diese ist partiell komplementär zu den durch photolithografische Festphasensynthese gebildeten Oligonukleotide (Sonden) auf einem Trägermaterial. Eine Hybridisierung von einer Antisense cRNA mit einer Sonde kann durch Bindung von Streptavidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin an das Biotin nachgewiesen werden.

Pro Probe gibt es mehrere Wiederholungen, sog. *Replika*. Die Expressionsdaten dieser Chips sind im hohen Maße reproduzierbar. Die industriell gefertigten Genchips basieren auf einem so genannten Microspotting. Die photolithographische Festphasensynthese ist die derzeit immer noch gebräuchlichste Form der DNA-Array Herstellung. Dabei werden die DNA-Moleküle direkt auf dem Glaträger-Biochip synthetisiert. Dazu werden photolabile Schutzgruppen (meist substituierte Carbonate wie NPPOC, die bei Bestrahlung CO_2 eliminieren) auf den Glaträger aufgebracht, die als Startpunkt für die Oligonukleotidsynthese dienen. Der Clou bei dieser Technologie liegt in der gerichteten Synthese der Oligonukleotide. Dies wird dadurch ermöglicht, dass eine Reihe photolithografischer Masken eingesetzt

werden, die eine ortsgebundene Synthese auf dem Glasträger ermöglichen. Die Spots, an denen die Synthese mit einem Nukleotid erfolgen soll, werden bestrahlt. Dadurch werden die entsprechenden Schutzgruppen entfernt und das eingesetzte Nukleotid mit neuer photolabiler Schutzgruppe kann an diese aktivierten Spots binden. Diese Entfernung der Schutzgruppen wird über die entsprechenden photolithografischen Masken gesteuert. Dieser Vorgang wiederholt sich für alle vier Basen solange, bis die entsprechende 25-mer lange Oligonukleotidsequenz entstanden ist. Es sind demnach vier unterschiedliche photolithografische Masken erforderlich.

Für jedes Gen gibt es auf dem Chip 11 Paare (*probe pairs*) von 25-mer Oligonukleotiden (*probe set*). Gleichbedeutend für den Begriff *probe set* steht die Bezeichnung Array-Element. Um die eigentlich schlechten Hybridisierungsbedingungen der sehr kurzen Oligonukleotide auszugleichen, verwendet Affymetrix 11 Oligonukleotidpaare, die aus unterschiedlichen Bereichen der Zielsequenz abgeleitet wurden (Abbildung 11).

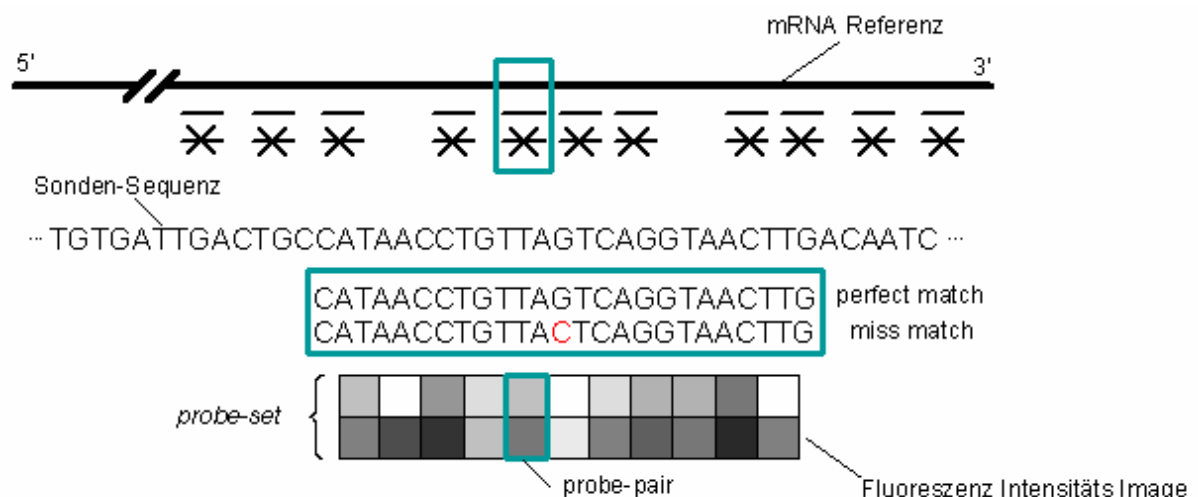


Abbildung 11: Darstellung der Oligonukleotid-Herstellung. Von der mRNA-Sequenz werden 11 identische Sequenzbereiche abgeleitet und entsprechen den *Perfect-Match* Oligonukleotiden. Analog dazu gibt es die *Miss-Match* Oligonukleotide. Jedes Oligonukleotid ist 25nt lang. Ein Paar an *Perfect-Match* sowie *Miss-Match* Oligonukleotiden bezeichnet man als *probe-pair*. Alle 11 Oligonukleotidpaare werden als *probe-set* benannt.

Zu jeder dieser Positionen werden 2 Oligonukleotide hergestellt, einmal ein *Perfect-Match* Oligonukleotid, das in Gänze der abgeleiteten Sequenz entspricht und des weiteren gibt es zu jeder Position ein *Miss-Match* Oligonukleotid, welches eine Fehlbase in der Mitte trägt (rot, Abbildung 11). Diese Fehlbase führt zu einer nicht optimalen Hybridisierung. Das Gesamtergebnis des Hybridisierungssignals errechnet sich aus dem Mittel aller Differenzen zwischen den *Perfect-Match* und *Miss-Match* Hybridisierungen. Das eigentliche Signal repräsentiert das relative Expressionslevel eines Transkriptes. Zum Nachweis eines oder mehrerer Transkripte liegen auf dem Chip demnach die *probe-sets* (Array-Elemente) in Form der Oligonukleotide vor. Auf dem ATH1-Chip befinden sich 22.810 Array-Elemente. Ein Array-Element kann auch mehrere Gene repräsentieren, da im Falle von Genfamilien ein Array-Element unterschiedliche Transkripte detektieren kann.

Zur Herstellung der zu hybridisierenden RNA werden die in der Gesamt-RNA enthaltenen Protein-kodierenden mRNAs (ca. 0.2-0.4%) der Pflanze in einer reversen Transkriptase Reaktion zunächst in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (Abbildung 10, Seite 22). Danach wird der komplementäre cDNA-Strang synthetisiert und die T7-Promotersequenz eingeführt. Diese Sequenz erlaubt in einer so genannten *in vitro* Transkriptionsreaktion mit Hilfe von T7-RNA Polymerase die Umschreibung der cDNA in biotinylierte Antisense-cRNA, die partiell komplementär zu den auf dem Chip enthaltenen Oligonukleotiden ist. Da jedes cDNA-Molekül viele Male abgeschrieben wird (lineare Amplifizierung), wird erst durch diesen Schritt genügend Material für eine Microarray-Hybridisierung (ca. 10µg cRNA) erhalten. Die Biotin-markierten cRNAs (*target*) werden nach Fragmentierung auf den Array hybridisiert. Der Nachweis erfolgt über die Biotin-Markierung. Nach dem Auswaschen nicht-komplementärer cRNAs werden die gebundenen komplementären cRNAs durch Bindung von Streptavidin gekoppelten Phycoerythrin an Biotin gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin kann dann durch Aktivierung mit Laserlicht in einen speziellen Scanner gemessen und quantifiziert werden.

Bei der kommerziellen Oligonukleotid-Array Methode handelt es sich um ein hoch standardisiertes System, welches leicht zu reproduzieren ist und einen hohen Durchsatz an Proben ermöglicht. Als Ergebnis wird je Transkript eine Signalstärke ausgegeben. Im Anschluss muss eigenständig ein Induktionsfaktor zwischen dem Signal der Probe und dem Signal der Kontrolle gebildet werden. Direkt nach dem Abschluss des Scannens eines Arrays werden die Hybridisierungs-Signale der einzelnen Oligonukleotide nach einer Umrechnung in einer Datei abgelegt. Danach werden die Rohdaten normalisiert, um Unterschiede nicht-biologischen Ursprungs (unterschiedliche Mengen cRNA im Hybridisierungsansatz etc.) auszugleichen. Das Signal ist ein relatives Maß der Häufigkeit des Transkripts in der analysierten Probe, während die Detektion des *p-values* die Verlässlichkeit der Messung beschreibt und die Signaldetektion (*present* = P, *marginal* = M, *absent* = A) bestimmt (GeneChip® Expression Analysis, Data Analysis Fundamentals, Firma Affymetrix). Als Resultat erzeugt die Software MAS5.0 eine Tabelle (so genannte CHP-Datei), die als Text-Datei exportiert werden kann und in der für jedes *probe-set* (Array-Element) Signal, *p-value*, Signaldetektion und einige weitere Parameter angegeben sind.

Rohdaten von Microarrayexperimenten können bei verschiedenen Datenbanken wie TAIR (Rhee *et al.*, 2003), NASCArrays (Craigon *et al.*, 2004), Geo (Barret und Edgar, 2006) oder ArrayExpress (Brazma *et al.*, 2006) herunter geladen werden. Die Daten sind frei zugänglich und können für verschiedene Fragestellungen, wie etwa die Identifizierung von koregulierten, Pathogen-induzierten Genen, verwendet werden.

1.8. Strategien zur Erzeugung resistenter Nutzpflanzen

Die Herstellung resistenter Nutzpflanzen ist von großem wirtschaftlichem Interesse, da jährlich ca. 12 Prozent der Produktion durch Pflanzenkrankheiten verloren gehen (James *et al.*, 1990).

Ein Ansatz zur Erzeugung resistenter Kulturpflanzen ist das Einbringen von einem oder mehreren R-Gen(en) einer verwandten Pflanzenspezies, um

aktive Genprodukte in der Zielpflanze zu erhalten (Rommens *et al.*, 1995; Tai *et al.*, 1999). Viele R-Gene aus verschiedenen Pflanzenspezies sind bereits identifiziert (Martin, 1999). Die R-Gene in der Modellpflanze *Arabidopsis* können über Sequenzhomologien in anderen Kulturpflanzen identifiziert werden, da die R-Gene ubiquitäre Domänen aufweisen (Young, 2000). Viele R-Gene sind genomisch in Clustern organisiert (Michelmore und Meyers, 1998). Diese Mehrfachanordnung von R-Genen könnte in Form langer DNA-Fragmente simultan transferiert werden (Hamilton, 1997). Allerdings sind viele R-Gene (z. B. *Pto*-Gen der Tomate) nur gegenüber bestimmten Pathogenarten funktionell (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* mit *avrPto*). Wird der relativ schwache endogene Promotor des *Pto*-Gens durch einen starken Promotor ersetzt, kann diese spezifische Resistenz auf die Arten *Xanthomonas campestris* und *Cladosporium fulvum* ausgeweitet werden (Tang *et al.*, 1999). Die Überexpression des NPR1-Gens in *Arabidopsis* führt zur Erweiterung und Verbesserung des Resistenzlevels gegenüber einer Vielzahl an Pathogenen (Cao *et al.*, 1998). NPR1 scheint ein geeigneter Kandidat für eine Anwendung in Kulturpflanzen darzustellen.

Auch *downstream* der Pathogenerkennung, wie etwa modifizierte Expressionsstärken von Transkriptionsfaktoren der PR-Gene (z. B. MYB1), können zu verbesserten Resistenzen gegenüber viralen (TMV) und fungalen (*Rhizoctonia solani*) Pathogenen führen (Klessing und Yang, Patent, 1999). Auch die Manipulation von Signalkomponenten innerhalb der Pflanze, wie z. B. reaktive Sauerstoffspezies, NO, SA, MJ oder Ethylen könnten das Spektrum der Resistenz erweitern. Ein synthetisches Analog der SA kann als Spray verwendet eine SAR in Kulturpflanzen auslösen (Görlach *et al.*, 1996). Das Protein Harpin, welche die TypIII-Sekretion von Effektoren bei pathogenen Bakterien reguliert, kann auf die Pflanze appliziert ebenfalls eine SAR auslösen (Moffat, 2001). Die Problematik dieser Resistenz ist, dass sie relativ unspezifisch ist.

Die Problematik kann durch verschiedene Strategien synthetischer Resistenzen gelöst werden. Zum einen können *avr*-Gene in Pflanzen exprimiert werden, welche die dazugehörigen R-Gene im Genom besitzen.

Dadurch wird künstlich eine kompatible Interaktion in der Pflanze bewirkt (Kim *et al.*, 2009). Eine weitere Strategie ist die Induktion einer des induzierten Zelltodes ähnlichen Reaktion durch das Barnase/Barstar-System, um das Pathogenwachstum zu inhibieren. Das Protein Barnase aus *Bacillus amyloliquefaciens* ist eine Ribonuklease (Hartley, 1989) und kann dazu genutzt werden, sterile männliche oder weibliche transgene Pflanzen zu erstellen (Mariani *et al.*, 1990). Das Barstar-Protein, ebenfalls aus *Bacillus amyloliquefaciens*, bindet spezifisch an Barnase und formt einen stabilen Komplex aus. Dadurch wird die RNase-Aktivität gehemmt (Hartley, 1989). Beim System zum induzierten Zelltod wird die bakterielle Ribonuklease durch Aktivierung eines Pathogen-induzierten Promotors exprimiert. Die transgenen Pflanzen besitzen zudem das Barstar-Gen, um eine Genexpression in nicht-infizierten Geweben zu unterdrücken und somit zu kontrollieren (Strittmatter *et al.*, 1995).

Dieses System muss allerdings hochspezifisch sein. Für die Erzeugung resistenter Nutzpflanzen kann eine hohe Spezifität durch synthetische Promotoren geleistet werden. Microarrays, wie zuvor beschrieben, können dazu verwendet werden, regulatorische Sequenzen zu identifizieren, die für die Konstruktion synthetischer Promotoren eingesetzt werden können. Die synthetischen Promotoren bestehen aus einer Kombination *cis*-regulatorischer Elemente, die aus verschiedenen Pathogen-induzierten Genen stammen. Ein idealer konstruierter synthetischer Promotor reagiert schnell auf eine große Anzahl angreifender Pathogene und vermittelt für ein breites Phytopathogenspektrum eine Resistenz. Der Promotor ist ohne Pathogenangriff inaktiv, so dass die Pflanze nicht unnötig eine Abwehrreaktion in Gang setzt (Rushton and Somssich, 1998; Rushton *et al.*, 2002).

Ein einfaches Prinzip von synthetischen Promotoren wurde bei Venter (2007) beschrieben. Er zeigt, dass bioinformatische Untersuchungen zur Erstellung von speziellen Promotorkonstrukten führen können, welche es der Pflanze ermöglichen eine kontrollierte Genexpression auf verschiedene äußere Bedingungen (abiotische wie biotische Stresse) zu verwirklichen. Ein synthetischer Promotor ermöglicht eine begrenzte, hohe Expression eines

Genproduktes z. B. an einer Infektionsstelle. Das gesunde Gewebe wird hierbei nicht in die Abwehrreaktion involviert. Zudem erlauben synthetische Promotoren eine Genexpression, die von verschiedenen Pathogenen ausgelöst werden kann.

In Pathogen-induzierten Promotoren liegen Elemente vor, welche eine induzierbare Expression ohne den nativen Promotorkontext auslösen können (Rushton *et al.*, 2002). Ein *cis*-Element, die GCC-Box (AGCCGCC), wird vermehrt in Genen identifiziert, die einen Pathogenbezug besitzen (Ohme-Takagi *et al.*, 2000). Ein GCC-verwandtes Motiv, die S-Box (AGCCACC), zeigte eine durch verschiedene PAMPs ausgelöste Expression (Kirsch *et al.*, 2000). Die W-Box ([T)TGAC(C/T)] wird von Mitgliedern der WRKY-Transkriptionsfaktoren erkannt und bildet die größte Klasse an *cis*-Elementen, welche für eine Pathogen-vermittelte Induzierbarkeit von pflanzlichen Genen vorliegt.

Die Anzahl und Kombination verschiedener *cis*-Elemente spielt bei einer Induzierbarkeit und Stärke künstlicher Promotoren eine wichtige Rolle. Über ein transientes System kann die Induzierbarkeit als solches und die Funktionalität der Elemente auf spezielle Pathogene *in planta* bewiesen werden (Rushton *et al.*, 2002). Nicht alle Elemente reagieren hinsichtlich Stärke und Induzierbarkeit gleich. Gründe hierfür sind Abstandsgrößen zur TATA-Box, potentielle Hintergrundaktivität, Kombinationen und Elementanzahl. Wichtig ist, dass die *cis*-Elemente über verschiedene Pflanzenspezies hoch konserviert sind. Diese Tatsachen zeigen, dass es möglich ist, neue *cis*-Elemente in einer Modellpflanze zu identifizieren, welche in der Anwendung untereinander kombiniert und in Form von synthetischen Promotoren eine gesteigerte Resistenz in Nutzpflanzen gegenüber verschiedenen Pathogenen vermitteln könnten.

1.9. Ziel dieser Arbeit

Das Ziel der Arbeit „Identifizierung neuer *cis*-regulatorischer Elemente durch bioinformatische und experimentelle Analyse Pathogen-induzierbarer Gene“ ist es, anhand von Transkriptomdaten neue, konservierte, Pathogen-responsive Promotorelemente zu detektieren und deren Induzierbarkeit mittels Reporter-gen-Aktivität *in vitro* nachzuweisen. Mit dem durchsequenzierten Genom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* und der frei zugänglichen Microarrayexperimente dieser Pflanze, die sich mit verschiedenen Phytopathogenen beschäftigen, wird eine breite Basis zur Identifizierung von neuen, Pathogen-bezogenen *cis*-Elementen ermöglicht (Abbildung 12).

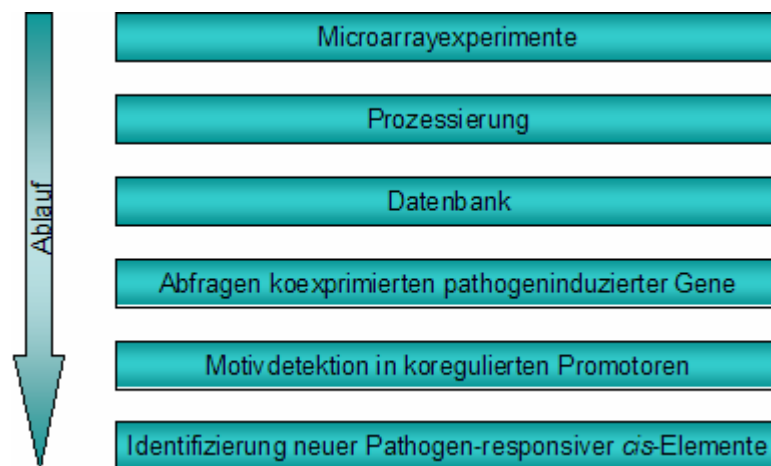


Abbildung 12: Ablauf der bioinformatischen Arbeitsschritte.

Die Microarraydaten werden herunter geladen und prozessiert, anschließend in einer einheitlichen Form in eine Datenbank importiert. An dieser Datenbank werden Abfragen durchgeführt, um koregulierte Gene zu identifizieren, die bei vielen pathogenen Stimuli, vornehmlich Ascomyceten und Oomyceten, hochreguliert sind. Mithilfe von verfügbarer Software werden konservierte Sequenzmotive detektiert und über einen Datenbank-Abgleich mit bekannten *cis*-Elementen neue *cis*-Elemente identifiziert. Mittels experimenteller Analysen werden diese auf ihre Funktionalität hin untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Microarray-Experimente

Die verwendeten Transkriptomdaten (Tabelle 1; <http://arabidopsis.org/>) beschäftigen sich mit einer Pathogeninfektion bei *Arabidopsis thaliana*. Die verschiedenen Pflanzenpathogene sind zum einen Pilze, Bakterien und Viren. Zum anderen können auch PAMPs und unterschiedliche Signalmoleküle eine Pathogenantwort bei einer Pflanze hervorrufen. Diese Datensätze wurden ebenfalls in die Arbeit integriert.

Tabelle 1: Übersicht aller verwendeten Arrayexperimente. Spalte 1 beinhaltet die Identifikationsnummer, sowie die Angabe über den Chip-Hersteller. Spalte 2 führt den originalen Experimentnamen auf und Spalte 3 gibt die Anzahl der Datensätze wieder, die verwendet wurden.

TAIR Id-Nr. (Chip-Hersteller)	Original-Experimentname	Anzahl Slides/ Datensätze
1008031468 (Affymetrix)	Response to <i>Erysiphe orontii</i> infection	48
1007966021 (Affymetrix)	Response to <i>Phytophthora infestans</i>	18
1007967417 (Affymetrix)	Response to <i>Botrytis cinerea</i> infection	12
1008031517 (Affymetrix)	<i>Pseudomonas</i> half leaf injection <i>(Pseudomonas syringae pv. maculicola pv. maculicola avrRpt2-)</i>	32
1007966202 (Affymetrix)	Response to virulent, avirulent, type III-secretion system deficient and nonhost bacteria <i>(Pseudomonas syringae pv. tomato pv. tomato avrRpm1 pv. tomato hrcC- pv. phaesiocola)</i>	48
1008080727 (Affymetrix)	Response to bacterial- (LPS, HrpZ, Flg22) and oomycete- (NPP1) derived elicitors (Flagellin22 HarpinZ Lipopolysaccharid Necrosis inducing <i>Phytophthora</i> protein 1)	38
1008080827 (Affymetrix)	Effect of ibuprofen, salicylic acid and diaminozide in seedlings	4
1007965964 (Affymetrix)	Methyl-Jasmonate time course in wildtype	12

TAIR Id-Nr. (Chip-Hersteller)	Original-Experimentname	Anzahl Slides/ Datensätze
1005823605 (Carnegie)	Chitin elicitation timecourse	12
1005823581 (Carnegie)	Ethylene treated leaves & seedlings	12
1005823574 (AFGC)	Cis-jasmone as a novel signalling molecule	4
1005823545 (AFGC)	Cell death (H ₂ O ₂)	4
1005823583 (AFGC)	Fungus inoculation <i>(F. virguliforme)</i>	4
1005823549 (AFGC)	<i>Powdery mildew</i> infection	4
1005823548 (AFGC)	Salicylic acid dependent signalling in <i>Arabidopsis</i>	2
1005823534 (AFGC)	<i>Phytophthora infestans</i> inoculation	4
1005823536 (AFGC)	<i>Xanthomonas</i> inoculation	4
1005823505 (AFGC)	Response to systemic virus infection (TMV)	4
1005823504 (AFGC)	TMV infection	4
1005823602 (AFGC)	Virus-induced regulation (TMV)	9

2.1.2. Software-Tools

2.1.2.1. Extraktion und Prozessierung der Expressions-Daten

Die Pathogen und Pathogen-verwandten Genexpressionsdaten (Tabelle 1) von *Arabidopsis thaliana* wurden von der TAIR Webseite (<http://arabidopsis.org/>; Reiser und Rhee, 2005) heruntergeladen. Die normalisierten Daten basieren auf Affymetrix- und cDNA-Microarrays (1.7.). Diese Expressionsdaten wurden prozessiert und in die PathoPlant[®] Datenbank (<http://www.pathoplant.de/>) importiert.

Die Prozessierung der cDNA-Transkriptomdaten (Datenbanktabelle *rawdatacdna*, Abbildung 14, Seite 36) wurde von Lorenz Bülow durchgeführt (Bülow *et al.*, 2006). Für die Prozessierung der Affymetrixdaten wurden die heruntergeladenen Text-Dateien der einzelnen Wiederholungsexperimente

(*Replika*) mit selbstprogrammierten Perl-Programmen unter dem Betriebssystem Linux Suse 9.2 verarbeitet. Zunächst wurden in einem Editorprogramm die Kopfzeilen und die Kontroll-Array-Elemente der Dateien eliminiert und mit einem vom originalen Datensatz abgeleiteten Namen (*sourcefile*) gespeichert. Mit selbstgeschriebenen Perl-Programmen (je nach Spaltenanzahl der Originaldatensätze) wurden die Array-Elemente, das Signal, die Signaldetektion P (*present*) oder M (*marginal*) oder A (*absent*) und der *p-value* aus den Experimenten von jeweils einer Probe und einer Kontrolle extrahiert und zusammengefasst. Mit Hilfe des entsprechenden Programmes wurde weiter ein Induktionsfaktor (Quotient) aus dem Signal der Probe und dem Signal der Kontrolle gebildet, um hochregulierte bzw. reprimierte Gene bestimmen zu können. Ist der erhaltene Wert <1 , so wurde der negative, reziproke Wert gebildet $[(-1)/Q]$. Der Wert wurde auf drei Nachkommastellen gerundet. Das Programm prüfte, ob die Array-Elemente der zwei Dateien (Probe, Kontrolle) identisch sind. Nebenbei bildete das Programm aus den beiden Signaldetektionen (P, M oder A) das Detektionspaar (PP, PM, MP, MM, PA MA, AM, AP oder AA). Nach dem Durchlauf erhielten die neuen Datensätze Namen aus den zusammengesetzten, originalen Proben- und Kontrolldatensätzen (*sourcefiles*). Die Reihenfolge der Datensätze, aus denen der Faktor gebildet wird, ist nicht von Bedeutung. Eine Überprüfung des geometrischen Mittels ergab immer den gleichen Faktor. Die prozessierten Daten aller Experimente wurden in einer Datei zusammengefasst und in die Datenbank in Form der Tabelle *rawdataaffy* (Abbildung 14, Seite 36) importiert. Über die *sourcefiles* können die zugrunde liegenden Datensätze der Wiederholungen (*Replikas*) identifiziert werden. Die Spalten der Tabelle besitzen die Namen: **id**, **ARRAY_ELEMENT**, **is_expressed**, **DETECTION_PROBE**, **SIGNAL_PROBE**, **P_VALUE_PROBE**, **DETECTION_CONTROL**, **SIGNAL_ CONTROL**, **P_VALUE_ CONTROL**, **fold_change**, **sourcefiles**, **stimulus** und **chip**.

Auf Datenbankebene enthält die Tabelle *rawdataaffy* nach dem Import über 3.000.000 Zeilen. Abbildung 13 zeigt einen Ausschnitt der Datenbanktabelle *rawdataaffy*. Die Spalte **id** enthält eine laufende Identifikationsnummer des jeweiligen Zeileneintrags. **ARRAY_ELEMENT** entspricht dem *probe set* des Arrays (Abbildung 11, Seite 23). Die Spalte **is_expressed** gibt das Detektionspaar (PP, PM, MP, MM, PA MA, AM, AP oder AA) wieder. Die

Spalten **DETECTION_PROBE**, **SIGNAL_PROBE** und **P_VALUE_PROBE** beinhalten die exportierten Rohdaten der Detektion, des Signals und des *p-values* vom Experiment mit Pathogenstimulus (*Probe*). Die Spalten **DETECTION_CONTROL**, **SIGNAL_CONTROL** und **P_VALUE_CONTROL** beinhalten die exportierten Rohdaten der Detektion, des Signals und des *p-values* vom Experiment der Kontrolle (*Control*). In der Spalte **fold_change** befindet sich der mittels Programm errechnete Induktionsfaktor (Quotient Signal Probe/Signal Kontrolle). Um einen Induktionsfaktor zu ermitteln, wurden immer zwei Datensätze (Probe und Kontrolle) verarbeitet. In der Spalte **sourcefiles** ist der Name aus den beiden zugrunde liegenden Datensätzen festgehalten, sowie in der Spalte **stimulus** das Pathogen, Signalmolekül oder PAMP, welches im Experiment verwendet wurde. In der letzten Zeile **chip** liegt die Information vor, von welchem Array-Typ die zugrunde liegenden Daten sind.

id	ARRAY_ELEMENT	is_expressed	DETECTION_PROBE	SIGNAL_PROBE	P_VALUE_PROBE	DETECTION_CONTROL	SIGNAL_CONTROL	P_VALUE_CONTROL	fold_change	sourcefiles	stimulus	chip
2669347	267555_at	PA	P	1688,3	0,000067	A	366	0,219462	48,2	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2669349	267557_at	FP	P	12978,8	0,000244	P	197,6	0,001221	65,7	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2669351	267559_at	PA	P	2786,7	0,000244	A	288	0,533906	96,8	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2670413	266955_at	PA	P	8006,4	0,000244	A	543	0,366211	98,2	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2670440	267012_at	PA	P	205,0	0,023906	A	120	0,460064	17,1	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2670462	266997_at	AA	A	72,3	0,246094	A	52	0,462373	13,9	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2670912	266950_s_at	PA	P	94,1	0,046148	A	52	0,696889	18,1	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2670949	266489_at	PA	P	1005,7	0,000732	A	33,1	0,460064	30,4	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2670968	266494_at	FP	P	1852,1	0,000244	P	189,6	0,001221	10,1	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2671262	266189_at	FP	P	4089,8	0,000244	P	381,7	0,000244	10,7	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2671267	266142_at	FP	P	1881,33	0,000244	P	562,5	0,000732	33,1	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2671283	266139_at	PA	P	439,0	0,004150	A	46	0,666527	95,4	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2671544	266913_at	PA	P	2513,7	0,000244	A	218,2	0,111572	11,4	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2671586	266930_at	AA	A	20,9	0,194580	A	1,4	0,981446	14,9	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2671612	266766_at	PA	P	1059,4	0,000244	A	122	0,633789	86,8	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2672423	266024_at	PA	P	176,4	0,014160	A	9,4	0,696889	18,8	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2672483	264589_at	FP	P	2947,6	0,000244	P	189,9	0,000273	16,0	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2672508	264403_s_at	PA	P	2261,0	0,000244	A	48	0,688613	471,0	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2672710	264246_at	FP	P	2015,4	0,000244	P	173,5	0,046148	11,6	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2672715	264216_at	PA	P	230,0	0,000244	A	122	0,257627	18,9	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2672717	264218_at	AA	A	42,4	0,219462	A	52	0,688613	10,1	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2672819	264608_at	AA	A	38,1	0,194580	A	3,1	0,601074	12,3	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2672830	264614_s_at	AA	A	145,1	0,194580	A	10,8	0,605460	13,4	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2672862	264450_at	PA	P	3313,7	0,000244	A	69,6	0,388465	47,6	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2673010	264445_at	PA	P	263,4	0,001221	A	48	0,870061	54,9	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2673028	264438_at	PA	P	842,3	0,000244	A	141	0,394471	59,7	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2673031	264401_at	FP	P	5625,0	0,000244	P	207,3	0,023906	26,7	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2673283	264418_at	PA	P	1016,5	0,000244	A	38,9	0,139339	26,1	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2674204	266320_at	PA	P	2120,4	0,000244	A	22,1	0,366211	96,8	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2674215	266321_at	PA	P	1225,3	0,000244	A	117,4	0,138609	10,4	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH
2674222	266328_at	PA	P	2227,7	0,000244	A	3,4	0,943948	685,2	BO181.tbxCH1811.tbx	B. d. nerea 18hp	ATH

Abbildung 13: Ausschnitt aus der Datenbanktabelle *rawdataaffy*. Die Tabelle besitzt die Tabellenspaltenüberschriften **id**, **ARRAY_ELEMENT**, **is_expressed**, **DETECTION_PROBE**, **SIGNAL_PROBE**, **P_VALUE_PROBE**, **DETECTION_CONTROL**, **SIGNAL_CONTROL**, **P_VALUE_CONTROL**, **fold_change**, **sourcefiles**, **stimulus** und **chip**.

Die Textdatei *affy_ATH1_array_elements_2006_07_14.txt* (Download: ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Microarrays/Affymetrix/old/affy_ATH1_array_elements-2006-07-14.txt) enthält die Zuordnung der 22.810 Array-Elemente

(*probe sets*) zu den Genidentifikationsnummern (AGI) der einzelnen *Arabidopsis* Gene. Die Identifizierung der repräsentierten Gene der entsprechenden Oligonukleotide wurde von TAIR in der Genomversion 6 mittels BLASTn bestimmt. Da in der *rawdataaffy* Tabelle die Gene nur über die Array-Elemente identifiziert werden, wurde eine Tabelle *assignments* erstellt (Abbildung 14, Seite 36), die für jedes Array-Element das zugehörige Gen mit der AGI identifiziert. Mit Hilfe eines selbstgeschriebenen Perl-Programmes wurde die TAIR-Textdatei verarbeitet und jedem Array-Element eine AGI zugeordnet. Dort, wo ein Array-Element genau ein Gen repräsentiert, wurde dieses mit dem Tag1 versehen. Da es auch vorkommt, dass mehrere Gene von einem Array-Element vertreten werden, wurden diese mit dem Tag0 versehen. Diese Zuordnungstabelle *assignments* besitzt die Spaltenüberschriften: **id, ARRAY_ELEMENT, LOCUS und tag** (Daten nicht gezeigt).

Einige Array-Elemente sind Kontrollelemente, andere zeigen ein so genanntes „no match“ nach einer BLAST-Analyse zu allen in der TAIR6 Genomversion annotierten Genen und wiederum andere repräsentieren aufgrund von Genfamilien mehrere Gene. Nach Berücksichtigung dieser Ereignisse ergibt sich eine Gesamtzahl abgedeckter Gene von 21.159, die tatsächlich zur Identifizierung von Transkripten zur Verfügung stehen. Das entspricht 67% der annotierten 31.407 Gene der TAIR6 Genomversion (ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Genes/TAIR6_genome_release/README_TAIR6).

Zum Verknüpfen der Tabellen wurde der Datensatz der Tabelle *rawdataaffy* mit dem Datensatz der Tabelle *assignments* kombiniert (Abbildung 14, Seite 36). Dieser Vorgang wird auf Datenbankebene als ein *Joining* bezeichnet. Das Ergebnis wird sichtbar in Form einer Pseudotabelle durch die Erzeugung eines *Views*. In der Tabelle wird ein neuer Datensatz mit allen beteiligten Attributen (Spaltenüberschriften) gebildet. Die verknüpften Array-Elemente aus den Tabellen *rawdataaffy* und *assignments* erlauben somit eine Lokuszuordnung. Bei den cDNA-Daten war eine solche Verknüpfung nicht notwendig, da bereits die Rohdaten der Experimente eine Lokuszuordnung enthielten.

Mit einem Visual Basic-Programm (Lorenz Bülow, modifiziert) wurden über einen SQL-Algorithmus *mean*-Werte bestimmt. Die Errechnung des geometrischen Mittels der Induktionsfaktoren (*mean*-Werte) der Replika-Datensätze wurde auf Datenbankebene durchgeführt und die Ergebnisse wurden in einer separaten Tabelle *means* gespeichert (Abbildung 14, Seite 36). Dabei wurden einmal von den Dateien das geometrische Mittel errechnet, welche PP, PM, MP oder MM im Detektionspaar aufwiesen (*mean*). Analog dazu wurde das geometrische Mittel von den Dateien ermittelt, welche PA, AP, MA, AM oder AA als Detektionspaar zeigten (*nomean*). Diese Werte wurden in den Spalten **mean** und **nomean** gespeichert. Außerdem wurden die Standardabweichung sowie die Anzahl der zugrunde liegenden Datensätze bestimmt. Diese Werte wurden in den Spalten **std**, **nostd**, **n** und **non** gespeichert. Die Spaltenüberschriften der Tabelle *means* sind: **id**, **stimulus**, **locus**, **mean**, **std**, **n**, **nomean**, **nostd** und **non** (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Tabelle *slides* (Abbildung 14, Seite 36) enthält Metadaten zu den Experimenten auf Basis der *sourcefiles*. Eine ausführliche Beschreibung des zugrunde liegenden Stimulus der jeweiligen Experimente befindet sich in der Spalte **stimulusext**. Weitere Informationen zu den jeweiligen Experimenten wie z. B. der originale Experimentname sowie eine ausführliche Beschreibung des Experimentes befinden sich in den Spalten **experiment** und **experimenttext**. Die Spaltenbezeichnung **arraytype** bezieht sich auf den Chiphersteller, mit welchem das Experiment durchgeführt wurde. Die Spaltenüberschriften lauten **id**, **sourcefiles**, **stimulus**, **stimulusext**, **experiment**, **experimenttext** und **arraytype** (Daten nicht gezeigt).

Die Grundlage zur Identifizierung koregulierter, Pathogen-induzierter Gene ist mit dem Vorhandensein dieser fünf Tabellen in Form einer Datenbank gegeben (Abbildung 14). Die gesamte Datenbankstruktur wurde so konzipiert, dass Aktualisierungen und Erweiterungen der Inhalte möglich sind.

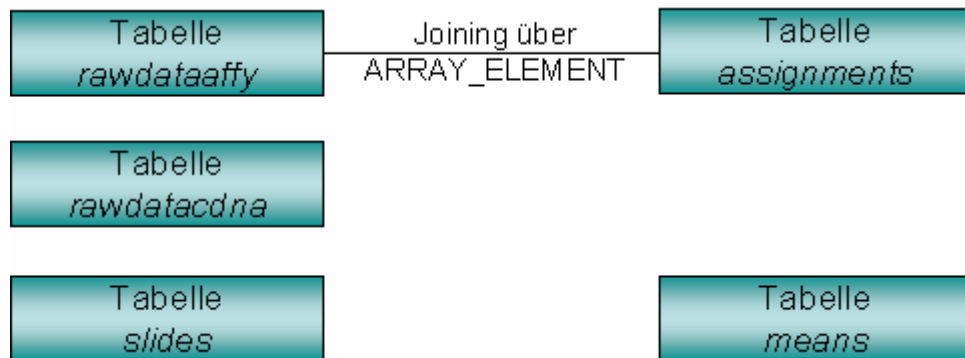


Abbildung 14: Übersicht der Datenbankstruktur. Die Datenbank besteht aus den 5 Tabellen *rawdataaffy*, *assignments*, *rawdatacdna*, *slides* und *means*. Die Tabellen *rawdataaffy* und *assignments* sind über ein *Joining* miteinander verknüpft, so dass über das Attribut *ARRAY_ELEMENT* eine Zuordnung zu einer Genidentifikationsnummer in einer Pseudo-Tabelle über einen *View* möglich ist.

2.1.2.2. Abfragetool zur Identifizierung koregulierter Gene

Es stehen durch die importierten Datensätze insgesamt 28 Stimuli zur Verfügung (Tabelle 1), die alle in unterschiedlichen Kombinationen abgefragt wurden. Zur Vereinfachung der Abfragen, um in diesen Datensätzen koregulierte Gene zu identifizieren, wurde ein *Visual Basic Server Tool* entwickelt.

Die Basis für dieses Tool stellte Lorenz Bülow zur Verfügung (persönliche Mitteilung). Es wurde an die entsprechenden Anforderungen angepasst. Abbildung 15 zeigt einen Screenshot der Benutzeroberfläche des *Visual Basic Server Tools*, bei dem es möglich ist, bis zu sechs verschiedene Stimuli auszuwählen und eine für die Datenbank umsetzbare Abfrage in Form einer SQL-Anweisung zu formulieren.

The screenshot shows a Windows application window titled "Form9" with a "Microarray query" section. It includes dropdown menus for "B. cinerea 48hpi" and "P. infestans all", and radio buttons for "Affy" (only PA, all) and "Induction factor" (mean, single). There are also fields for "Limits" (2, 3) and "ORDER BY" (LOCUS). A "Build" button is visible. Below the form, a SQL query is displayed, and a table of 2010 records is shown. The table has columns: ARRAY_ELEMENT, is_expressed, DETECTION, IAL_PROBE, UE_PROBE, DETECTION, CONTROL, fold_change, and sourcefiles. The table contains 20 rows of data.

ARRAY_ELEMENT	is_expressed	DETECTION	IAL_PROBE	UE_PROBE	DETECTION	CONTROL	fold_change	sourcefiles
259428_at	PP	P	2566.8999	0.000244	P	876.70001	0.000244	2.928 BC4821.txtC
259428_at	PP	P	854.09998	0.000244	P	385.79999	8590001E-3	2.214 BC4811.txtC
259428_at	PP	P	1370.7	0.000244	P	487.79999	0.000244	2.8099999 BC4822.txtC
259428_at	PP	P	132.7	0.00122	P	52	8549999E-2	2.552 C12ATGEN:
259428_at	PM	P	103	1499999E-3	M	47.599998	6150001E-2	2.164 C18ATGEN:
264178_at	PP	P	2485	0.000244	P	1181.9	0.000244	2.1029999 BC4821.txtC
264178_at	PP	P	2413.3999	0.000244	P	1139.1	0.000244	2.119 BC4822.txtC
264178_at	PP	P	588.29999	3999999E-4	P	203.89999	3999999E-4	2.885 C10ATGEN:
264178_at	PP	P	507.70001	3999999E-4	P	185.89999	3999999E-4	2.7309999 C12ATGEN:
260915_at	PP	P	65.400002	1499999E-3	P	26.5	8599999E-3	2.4679999 C15ATGEN:
260915_at	PP	P	312.39999	3999999E-4	P	134.89999	3999999E-4	2.316 C12ATGEN:
260915_at	PP	P	564.09998	0.000244	P	251.10001	0.000244	2.247 BC4822.txtC
263112_at	PP	P	734.29999	0.000244	P	266.39999	3199999E-4	2.756 BC4822.txtC
263112_at	PP	P	183.39999	3999999E-4	P	78.199997	1499999E-3	2.345 C10ATGEN:
261155_at	PP	P	447.79999	0.01416	P	217.8	8549999E-2	2.056 C10ATGEN:
261155_at	PP	P	1680.6	0.000244	P	700.70001	1499999E-3	2.398 BC4821.txtC

Abbildung 15: Benutzeroberfläche des *Visual Basic Server Tools*. Es können bis zu 6 verschiedene Stimuli ausgewählt werden. Es kann eine untere und obere Induktionsfaktorgrenze (*Limits*) frei eingestellt werden. Die Stimuli können als *AND* (Schnittmenge) oder *OR* (Gesamtmenge) miteinander verglichen werden (*Stimulus*). Es können die *mean*- (Mittel-) oder *single*- (Einzel-) Werte der Induktionsfaktoren der Datensätze angezeigt werden (*Induktion factor*). Bei den Affymetrixdaten können *PA* (induzierte) oder *all* (hochregulierte) Gene angezeigt werden (*Affy*). Eine Sortierung kann über die AGI erfolgen (*ORDER BY*). Über den *Build*-Button wird die SQL-Anforderung an die DB formuliert. Über den *Submit*-Button wird die Anweisung an die DB geschickt. Im unteren Fenster wird eine Pseudotabelle mit allen angeforderten Attributen ausgegeben, welche über den *Copy*-Button in Excel überführt werden kann.

Affymetrix bzw. cDNA-Abfragen können einzeln oder kombiniert durchgeführt werden. Das Tool erlaubt die Identifizierung koregulierter Gene, die bei bis zu sechs verschiedenen Stimuli hochreguliert bzw. induziert werden (Induktionsfaktoren frei wählbar). Ziel ist es, von möglichst vielen Stimuli koregulierte Gene zu identifizieren. Dabei kommen diejenigen Expressionsdaten zum Einsatz, welche laut Experimentator verlässliche Signale geliefert haben. Das sind bei den Affymetrix-Daten Signale, die *present* oder *marginal* sind, bzw. bei den cDNA-Daten die Bezeichnung *is_expressed* mit *yes* führen.

Eine besondere Abfrage kann bei den Affymetrix-Daten erfolgen, wobei induzierte Gene identifiziert werden können. Bezeichnet wurden diese als *PA*-Abfrage. Hierbei ist das Transkript in der Kontrolle eines Gens nicht vorhanden (*absent*), wohingegen nach einer Stimulation der Transkriptgehalt vorhanden (*present*) ist. Das Gen wurde demnach induziert und weist als

Detektionspaar (*is_expressed*) in der Tabelle die Bezeichnung PA auf. Allerdings gibt es hierbei auch Fehlinterpretationen, da aufgrund der Hybridisierung der verwendeten RNA oder ein Signal aus Qualitätsgründen der Durchführung ebenfalls als *absent* gewertet werden kann. Die Ergebnisse der PA-Abfragen müssen deshalb noch weiter von Hand bearbeitet werden. Dabei werden nur die Gene ausgewählt, welche mindestens zwei Mal (zwei Replikas eines Zeitpunktes einer Stimuli-Behandlung) das PA-Ereignis aufweisen. Eine automatische Abfrage, bei der alle Replika-Slides das PA-Ereignis aufweisen, ist ebenfalls möglich, führt jedoch zu deutlich weniger Treffern.

Zur Identifizierung koregulierter Gene wurden schwerpunktmäßig Datenbankabfragen von den Experimenten gemacht, die die Ascomyceten *B. cinerea* und *E. orontii* betreffen bzw. den Oomycet *P. infestans* in Kombination mit den weiteren 25 zur Verfügung stehenden Stimuli (Anhang 8.7.).

2.1.2.3. Sequenzextraktion der Promotoren

Die identifizierten Sets an koregulierten Genen wurden mit dem selbstgeschriebenen Perlskript *form.1agi.pl* in eine für den nächsten Prozessierungsschritt benötigte Form umgewandelt. Das Programm übernimmt eine AGI-Liste und fügt an jedes Zeilenende die Bezeichnung .1 an. Zudem wird eine einheitliche Groß- und Kleinschreibung kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Mit Hilfe dieser Liste können aus einer Textdatei (FeaturesUpDown.txt, Claudia Galuschka, pers. Mitteilung) alle Genpositionsinformationen der TAIR6-Genomversion für die vorliegenden Gene identifiziert werden. Beispielhaft an Position x beginnt die 5'UTR des Gens y. Ausgehend von diesen Informationen wurde mit Hilfe des Perl-Programms *ready_for_extract12_neu.pl* die Start- und Stopp-Position der zu extrahierenden Promotor-Sequenz bestimmt. Das Programm liest eine Genliste ein und erstellt eine Ausgabedatei mit den errechneten Positionen. Dabei wurde immer die genomische Position -1 bp vom Transkriptionsstart (TSS) bzw. -1000 bp vom TSS ermittelt. Es wurden nur die Positionen von den

Genen bestimmt, bei denen der TSS bekannt ist. Im Folgenden wurde das Extraktionstool *ExtractSequencesChooseReverseFeature2_1.pl* (Claudia Galuschka, modifiziert) verwendet. Hierbei wurden ausgehend von den zuvor ermittelten Positionen die Promotorsequenzen aus der TAIR6 Genomversion extrahiert. Die Ausgabedatei besitzt das Fasta-Format.

2.1.2.4. Identifizierung konservierter Sequenzmotive

Mit Hilfe der frei verfügbaren Software BEST (*Binding-site Estimation Suite of Tools*; Che *et al.*, 2005; <http://www.cs.uga.edu/~che/BEST/>), welches unter dem Betriebssystem Linux funktioniert, wurde in den extrahierten Promotorbereichen der koregulierten Gene nach hochkonservierten Sequenzen gesucht, die potentielle *cis*-regulatorische Elemente darstellen.

BEST beinhaltet vier verschiedene Motiv-findende Programme: AlignACE (Roth *et al.*, 1998), BioProspector (Liu *et al.*, 2001a), CONSENSUS (Hertz und Stormo, 1999) und MEME (Bailey und Elkan, 1994). Sie können innerhalb einer Sammlung von Sequenzen konservierte Sequenzmuster, so genannte Motive, auffinden. Das Softwarepaket BEST beinhaltet darüber hinaus das Optimierungs-Programm BioOptimizer (Jensen und Liu, 2004), welches aus den erhaltenen Daten das beste gemeinsame Motiv ermittelt. Das Softwarepaket wurde heruntergeladen und unter dem Betriebssystem Linux Suse 9.2 lokal installiert. Die erstellten Fasta-Ausgabedateien (2.1.2.3.) der Promotorsequenzen der koregulierten Gene wurden für die Detektion nach konservierten Sequenzmotiven verwendet. Die zu suchende Motivlänge lag zwischen 5 und 20 Nukleotiden. Es wurden je Promotorset drei Durchgänge mit den Motivlängen 5-10, 10-15 und 15-20 durchgeführt. Als Motiv wurden solche Sequenzen gewertet, die von mindestens 2 verschiedenen Programmen identifiziert wurden und mindestens vier identische, hochkonservierte Nukleotide aufwiesen. Von der Software BEST wird immer dann ein Nukleotid an einer bestimmten Position als hochkonserviert (Großbuchstabe in der Consensussequenz) dargestellt, wenn es in über 75 Prozent der Einzelsequenzen, die dem Motiv zugrunde liegen, vorkommt. Das beste Motiv besitzt in der BEST-Summarytabellen den höchsten BioOptimizer-

Score. Ein Motiv besteht aus mehreren Einzelsequenzen, welche in einer gewichteten Matrize (PSSM) zusammen gefasst dargestellt sind. Von dem besten Motiv wird über den Score die dazugehörige Matrize der entsprechenden Programm-Ausgabedatei für weitere Analysen eingesetzt.

In der Programm-Ausgabedatei des besten Motivs befinden sich Angaben über die Anzahl der Einzelsequenzen, die diesem Motiv zugrunde liegen und über die Gene, dessen Promotoren das Motiv tragen. Das sind Informationen über die Position des Motivs in den Einzelsequenzen und die detektierte Orientierung der jeweiligen Motive. Es liegt ein Perl-Programm *output_best_KWS.pl* (Wiebke Ahrend, persönliche Mitteilung) vor, mit dessen Hilfe die Einzelsequenzen ausgewertet wurden. Hierbei wurden die Positionen der Einzelsequenzen in den Genpromotoren bestimmt und sortiert. Weiter wird ein Prozentsatz berechnet, der angibt, wie viel Prozent der Einzelsequenz der Consensussequenz entspricht. Außerdem fasst das Programm allgemeine Angaben der Abfrage und BEST-Analyse zusammen. Es gibt an, wie viele koregulierte Gene bei der Abfrage identifiziert wurden, wie viele dieser Gene einen bekannten Transkriptionsstart besitzen und wie viele davon das Motiv besitzen. Diese Informationen gehen in die Auswahlkriterien für die experimentelle Analyse einer Einzelsequenz ein (3.8.).

2.1.2.5. Klassifizierung der Motive

Die detektierten Motive wurden mit Hilfe des Web-Servers STAMP (Mahony und Benos, 2007) (<http://www.benoslab.pitt.edu/stamp/>) weiter analysiert. Der Webserver STAMP ermöglicht einen Vergleich von Motiven (potentiellen *cis*-Elementen) mit bekannten *cis*-regulatorischen Elementen verschiedener Datenbanken. Dabei fand ein Abgleich mit pflanzlichen *cis*-Elementen bzw. Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TF-BS) aus den Datenbanken AGRIS (Palaniswamy *et al.*, 2006), PLACE (Higo *et al.*, 1999) und AthaMap (Steffens *et al.*, 2004; Steffens *et al.*, 2005) statt.

Der Webserver wurde ebenfalls dafür genutzt, um die Motive zu klassifizieren. Von den so erstellten Motivgruppen konnten Familienprofile in Form von Matrizen mit Hilfe des Webserver erstellt und diese nochmals mit Datenbanken von *cis*-Elementen bzw. Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren verglichen werden. Je nach vorhandener Homologie wurden die Motivgruppen einer potentiellen Transkriptionsfaktorfamilie zugeordnet. Die zugrunde liegenden Matrizen der detektierten Motive (2.1.2.4.) wurden dazu in einer Eingabedatei zusammengefasst (Digital C auf beiliegender CD-ROM) und die entsprechenden Analysen wurden mithilfe des Webserver durchgeführt.

2.1.3. Technische Geräte

Tabelle 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten technischen Geräte. Diese sind mit Gerätebezeichnung und Hersteller aufgeführt.

Gerät	Hersteller
Elektrophoresekammer	BIOzym
Elektroporator Gene Pulser [®] II	Biorad
Exsikator F10	Julabo
Gel-Dokumentation	Biorad
Heizblock	Eppendorf
Laborzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Laborzentrifuge Biofuge 22R	Heraeus
Laborzentrifuge GS-6KR Centrifuge	Beckmann
Laborzentrifuge RC-5B	Sorvall
Luminescence Spectrometer LS50B	Perkin Elmer
PCR Mastercycler [®] Personal	Eppendorf
Schüttler	Eppendorf
Schüttler RS-306	Infors
Sequenzierer ABI Prism [®] 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
SpeedVac Vacuum concentrator	Bachofer
Sterilbank LaminAir	Heraeus
Schwenktisch (25°C) Celloshaker Variospeed	Chemetron (Italien)
TriStar [®] LB 941	Berthold Technologies GmbH & Co. KG
Ultraspec 2000 UV/Visible Spectrophotometer	Biotech
Vortexer REAX 2000	Heidolph
Wasserbad The Belly Dancer [®]	Stovall Life Science, INC
Wasserbad	GFL

2.1.4. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen mit Hersteller bzw. Lieferantennachweis.

Substanz	Hersteller/ Lieferant
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Carl Roth GmbH & Co. KG
2,4-D (Dichlorphenoxyessigsäure)	Duchefa
4-Methylumbelliferyl-beta-D-glucoronid (4-MUG)	Serva
6-Benzylaminopurin (BAP)	Duchefa
8-Hydroxychinolin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
β-Mercaptoethanol	AppliChem
ABI-Premix	Applied Biosystems
Adenosintriphosphat (ATP)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG
Agarose	Invitrogen/ Biozym
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Serva
Bacto™-Trypton	BD (Becton, Dickinson and Company)
Bacto™-Yeast Extract	BD (Becton, Dickinson and Company)
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bromphenolblau	Serva
Calciumchlorid (CaCl ₂ x 2H ₂ O)	Merck
Calciumnitrat (Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Chloroform (CHCl ₃)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Di-Natriumsalz EDTA (Na ₂ -EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG
EDTA (Ethyldiaminteressigsäure, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Eisensulfat (FeSO ₄ x 7H ₂ O)	Riedel-de Haën
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ficoll-400	AppliChem/ Sigma
Glucose	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycerin (C ₃ H ₈ O ₃)	AppliChem
Glycogen	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycylglycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Hidi	Applied Biosystems
Isoamylalkohol (C ₅ H ₈ O)	Merck
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumacetat (C ₂ H ₃ KO ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumjodid (KJ)	J. T. Baker
Kaliumnitrat (KNO ₃)	J. T. Baker/ Sigma

Substanz	Hersteller/ Lieferant
Kobaltchlorid ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	Riedel-de Haën
Kupfersulfat ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Magnesiumchlorid (MgCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Mangansulfat ($\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)	Riedel-de Haën
Mannit (Mannitol)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methyljasmonat (MJ)	Duchefa
Myo-Inositol	Duchefa
Natriumacetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG/ Merck
Natriummolybdat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumphosphat (NaPO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Nikotinsäure	Duchefa
N-Laurosylarcosin	Serva
Polyethylenglykol (PEG)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Pyridoxine x HCl	Duchefa
Roti [®] -Phenol	Carl Roth GmbH & Co. KG
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salizylsäure	Duchefa
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Thiamine x HCl	Duchefa
TRIS (Trishydroxymethylaminomethan, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG
Xylencyanol	Biorad
Zinksulfat ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	J. T. Baker

2.1.5. Medien

Alle Medien wurden direkt nach dem Ansetzen für 20 Minuten bei 120°C autoklaviert.

- **B5-Medium**

3,164g	Gamborg B5 Medium (Duchefa, #G0210.0050)
79,27g	Glucose-Monohydrat
30g	D(+)-Saccharose
1ml	0,1 mg/ml 2,4-D
150µl	0,1 mg/ml BAP

mit H₂O_{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 1000ml auffüllen.

Der pH-Wert des Mediums wird mit 1M Kaliumhydroxid auf 5,8 eingestellt.

- **dyt-Medium**

16g	Bacto™-Trypton
10g	Bacto™-Yeast Extract
5g	Natriumchlorid

mit H₂O_{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 1000ml auffüllen.

- **HA-Medium**

2500mg	KNO ₃
171mg	CaCl ₂ x 2H ₂ O
250mg	MgSO ₄ x 7H ₂ O
134mg	(NH ₄) ₂ SO ₄
150mg	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
0,75mg	Kaliumjodid
2,5ml	Eisen-EDTA (2.1.6.)
1ml	Spurenelemente (2.1.6.)
10ml	B5-Vitamine (2.1.6.)
10ml	0,1 mg/ml 2,4-D
20g	D(+)-Saccharose

mit H₂O_{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 1000ml auffüllen.

Der pH-Wert des Mediums wird mit 1M Kaliumhydroxid (KOH) auf 5,5 eingestellt.

Portionierung von 40ml Medium in 100ml Weithals-Erlenmeyerkolben.

- **Luria-Bertani-Medium (LB)**

10g
5g
10g

Bacto™-Trypton
Bacto™-Yeast Extract
Natriumchlorid

mit H₂O_{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 1000ml auffüllen.

Der pH-Wert des Mediums wird mit Natriumhydroxid auf 7,5 eingestellt.

Für Festmedien werden 15g Agar auf 1000ml Medium hinzu gegeben.

- **Mannit-Medium**

4,61g
3mM
0,152g

Mannit
MES (pH 5,7)
MgCl x 4 H₂O

mit H₂O_{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 50ml auffüllen und sterilfiltrieren. Bei RT lagern.

- **½ MS-Medium**
Murashige und Skoog (1962)

2,45g

Murashige & Skoog Fertig-Medium
(Duchefa #M0255.0050)

mit H₂O_{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 1000ml auffüllen.

Der pH-Wert des Mediums wird mit 1M Kaliumhydroxid auf 5,8 – 6,0 eingestellt.

Für Festmedien werden 8g Agar auf 1000ml Medium hinzu gegeben.

- **P5-Medium**

96,9g
3,165g

D(+)-Saccharose
Gamborgs B5 Fertig-Medium
(Duchefa, #G0210.0050)
0,1 mg/ml 2,4-D

10ml

mit H₂O_{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 1000ml auffüllen.

Der pH-Wert des Mediums wird mit 1M Kaliumhydroxid auf 5,7 eingestellt.

- **SOC-Medium**

4g	Bacto™-Trypton
1g	Bacto™-Yeast Extract
0,1g	Natriumchlorid
0,04g	Kaliumchlorid

mit H₂O_{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 200ml auffüllen.

Der pH-Wert des Mediums wird mit 1M Kaliumhydroxid auf 5,8 – 6,0 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden folgende sterilfiltrierte Zusätze hinzu gegeben:

2ml	1M Magnesiumchlorid
2ml	1M Magnesiumsulfat
2ml	2M Glucose

2.1.6. Lösungen

- **0,1 mg/ml 2,4-D**

- **10x Ladepuffer**

25mg	Bromphenolblau
25mg	Xylencyanol
2,5g	Ficoll-400

mit H₂O_{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 10ml auffüllen.

- **50x TAE
Elektrophoresepuffer**

242g	TRIS
57,1ml	konzentrierte Essigsäure
100ml	0,5M EDTA pH 8,0

mit H₂O_{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 1000ml auffüllen.

- **Ammoniumsulfat -
Lösung**

134mg	(NH ₄) ₂ SO ₄
-------	---

mit H₂O_{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 1000ml auffüllen.

- **AtPep1-Lösung (10µM)**

- **AtPep2-Lösung (10µM)**

- **2,4M Calciumchlorid**

• Calciumnitrat-Lösung	0,275M 2mM	Calciumnitrat MES
mit H ₂ O _{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 1000ml auffüllen. Der pH-Wert dieser Lösung wird mit 1M Kaliumhydroxid auf 6,0 eingestellt.		

• Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1)	450ml 20ml	Chloroform Isoamylalkohol
--	---------------	------------------------------

• Denaturierungslösung Mini-DNA-Präparation	0,2M 1%	NaOH SDS
--	------------	-------------

- **0,5M EDTA**

• Eisen-EDTA-Lösung	2780mg 3730mg	FeSO ₄ x 7H ₂ O Na ₂ -EDTA
mit H ₂ O _{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 500ml auffüllen.		

• Enzymlösung (<i>Arabidopsis</i>)	0,36% 0,12%	(w/v) Cellulase R-10 (w/v) Macerozym R-10
mit B5-Medium lösen und ca. 20 min rühren lassen. 20 Min bei 4°C und 4000rpm (Untertischzentrifuge) zentrifugieren, sterilfiltrieren und in 14ml Aliquots bei -20 °C lagern		

• Enzymlösung (<i>Petersilie</i>)	0,5% 0,2%	(w/v) Cellulase R-10 (w/v) Macerozym R-10
mit 0,24M CaCl ₂ auf ein Gesamtvolumen von 30ml auffüllen. Ca. 2 Stunden langsam rühren lassen. Steril filtrieren.		

- **Ethanol, 70%**

- **Ethanol, 96%**

- Ethidiumbromid, 1% (v/v)
- Flg22-Lösung (100 μ M)
- Glycerin, 10% (v/v)
- Glycogen (10mg/ml)
- 25mM Glycylglycin (pH 7,8)

• GUS-Proteinextraktionspuffer	50mM	NaPO ₄ (pH 7,0)
	10mM	EDTA
	0,1%	Triton X-100 (v/v)
	0,1%	N-Laurosylarcosin
	10mM	β -Mercaptoethanol
β -Mercaptoethanol wird frisch dazugeben. Lösung in sterilem ddH ₂ O ansetzen und kühl lagern.		

• GUS-Reaktionspuffer	9 μ l	β -Mercaptoethanol
	2,8mg	4-MUG
In 7ml GUS-Proteinextraktionspuffer kurz vor Gebrauch ansetzen.		

- Isopropanol
- 5M Kaliumacetat
- 1M Kaliumhydroxid

• Lösung 1 (Maxi-DNA-Präparation)	50ml	1M TRIS/HCl pH 8,0
	20ml	0,5M EDTA
mit H ₂ O _{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 1000ml auffüllen und autoklavieren.		

• Lösung 2 (Maxi-DNA-Präparation)	8g	Natriumhydroxid
	10g	SDS
mit H ₂ O _{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 1000ml auffüllen.		

- | | | | |
|--|----------------------|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> Lösung 3 (Maxi-DNA-Präparation) | 294,42g
20ml | Kaliumacetat
Essigsäure | mit H ₂ O _{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 1000ml auffüllen. |
| <ul style="list-style-type: none"> LTE-Puffer | 10mM
0,1mM | TRIS/HCl pH 7,5
EDTA | mit H ₂ O _{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 200ml auffüllen. |
| <ul style="list-style-type: none"> LUC-Proteinextraktionspuffer | 0,1M
1mM | NaH ₂ PO ₄ (pH 7,8)
DTT | |
| <ul style="list-style-type: none"> LUC-Reaktionspuffer | 25mM
5mM
15mM | GlycylGlycyl
ATP
MgSO ₄ | In 7ml LUC-Proteinextraktionspuffer kurz vor Gebrauch ansetzen. |
| <ul style="list-style-type: none"> Luziferin-Lösung | 10mg | Luziferin | In 3,57ml 25mM Glycylglycin (pH7.8) lösen. 40µl Aliquots bei -20°C lagern. Vor Gebrauch Aliquot in 2ml 25mM Glycylglycin aufnehmen. |
| <ul style="list-style-type: none"> Lysozym-Lösung | 240mg
1ml
23ml | Lysozym
RNase (10 mg/ml)
Lösung 1 | auf Eis lösen lassen. |
- 0,5M Methyljasmonat-Lösung**
 - 3M Natriumacetat (pH 5,2)**
 - 200mM Natriumcarbonat**
 - 0,5M Natriumphosphat**

• P5-Vitamine	5000mg 50mg 50mg 500mg	Myo-Inositol Nikotinsäure Pyridoxine Thiamine	mit H ₂ O _{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 500ml auffüllen. Bei 4°C lagern.
• PEG-Lösung (Arabidopsis)	0,1M 0,4M 30% (w/v)	Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O Mannit PEG4000	mit H ₂ O _{bidest.} ansetzen. Sterilfiltrieren und in 5ml Aliquots bei -20°C wegfrieren. Der pH-Wert dieser Lösung wird mit 1M Kaliumhydroxid (KOH) auf 7,0-9,0 eingestellt (dauert einige Stunden).
• PEG-Lösung (Petersilie)	25g 2,36g 8,2g 25mg 39mg 25mg	H ₃ BO ₃ (Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O) Mannit Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O CuSO ₄ x 5H ₂ O CoCl ₂ x 6H ₂ O	mit H ₂ O _{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 100ml auffüllen. Sterilfiltrieren und in 5ml Aliquots bei -20°C wegfrieren. Der pH-Wert dieser Lösung wird mit 1M Kaliumhydroxid (KOH) auf 9,0 eingestellt (dauert einige Stunden).
• Pep25 (100µg/ml)			
• Phenol/Chloroform	500ml 500ml 0,5g	Roti®-Phenol Chloroform 8-Hydroxychinolin	
• Phenol/Chloroform Isoamylalkohol (25:24:1)	500ml 480ml 20ml 0,5g	Roti®-Phenol Chloroform Isoamylalkohol 8-Hydroxychinolin	
• Renaturierungslösung Mini-DNA-Präparation	60ml 11,5ml	5M Kaliumacetat pH 4,8 Eisessig	mit H ₂ O _{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 100ml auffüllen.

- Saccharose-Lösung, 21% (w/v)

- 0,5M Salizylsäure-Lösung

- 1M Salzsäure

- Spurenelemente

300mg	H_3BO_3
1120mg	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
300mg	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
25mg	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
39mg	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
25mg	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf ein Gesamtvolumen von 100ml auffüllen.

1ml Aliquots dunkel lagern.

- TE-Puffer

10mM	1M TRIS/HCl pH 8,0
1mM	0,5M EDTA pH 8,0

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf ein Gesamtvolumen von 200ml auffüllen.

- W5-Puffer

17,96g	NaCl
36,72g	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
745,6mg	KCl
1,802g	Glucose (wasserfrei)

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf ein Gesamtvolumen von 1000ml auffüllen.

Der pH-Wert dieser Lösung wird mit 1M Kaliumhydroxid (KOH) auf 5,8 – 6,0 eingestellt.

Die Lösung wird autoklaviert und bei RT gelagert.

- Zellsuspensionslösung
Mini-DNA-Präparation

50mM	Glucose
10mM	0,5M EDTA pH 8,0
25mM	TRIS/HCl pH 8,0

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf ein Gesamtvolumen von 1000ml auffüllen.

2.1.7. Enzyme/Peptide

Tabelle 4: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme bzw. Peptide. Spalte 1 gibt die Bezeichnung wieder, Spalte 2 beinhaltet Angaben über den Hersteller und in Spalte 3 sind zusätzliche Bemerkungen hinterlegt.

Enzym/Peptid	Hersteller	Bemerkung
AtPep1*	PANATecs GmbH	23AS
AtPep2*	PANATecs GmbH	36AS
Cellulase R-10	Duchefa	
CIAP (alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)	MBI Fermentas	1U/μl
DNase I (RNase frei)	MBI Fermentas	1U/μl
Flg22*	PANATecs GmbH	22AS
Lysozym	Carl Roth GmbH & Co KG	
Macerozym R-10	Duchefa	
Pep25*	SeqLab	25AS
Restriktionsenzym SacI	MBI Fermentas	5U/μl
Restriktionsenzym SpeI	MBI Fermentas	5U/μl
Restriktionsenzym XbaI	MBI Fermentas	5U/μl
RNaseI	Serva	
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas	5U/μl
Taq DNA Polymerase "omni-taq-OLS®"	OMNI Life Science	5U/μl

*Für die vier Peptide sind im Folgenden die Aminosäuresequenzen aufgeführt:

AtPep1: ATKVKAKQRGKEKVSSGRPGQHN

AtPep2: DNKAKSKKRDKEKPSSGRPGQTNSVPNAAIQVYKED

Flg22: QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA

Pep25: DVTAGAEVWNQPVRGFKVYEQTEMT

2.1.8. Kits

Tabelle 5: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Kits mit Hersteller und Katalognummer.

Kit	Hersteller	Katalognummer
Dye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	433745
NucleoSpin [®] ExtractII	Machery-Nagel GmbH & Co. KG	740609.50
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	28106

2.1.9. Plasmide/DNA

- Das Plasmid MS23-GUS (TATA-pBT10-GUS; Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000) wurde zur Klonierung der potentiellen *cis*-Elemente verwendet. Es verfügt als Selektionsmarker über eine Ampicillin-Resistenz (Amp^r) und enthält ein GUS-Reportergen mit davor geschaltetem Minimalpromotor. Die Vektorsequenz hat eine Länge von 4303 bp. Die vollständige Sequenz befindet sich im Anhang 8.1..
- Plasmid pBINGUSintron-sbA-VirG726-pm
Von der Planta GmbH (Einbeck) zur Verfügung gestellter binärer T-DNA Vektor. Die T-DNA Region enthält ein β -Glucuronidase-Gen (GUS). Dieses Gen beinhaltet ein Intron in der codierenden Region und steht unter der Kontrolle eines 35S-Promotors. Als Selektionsmarker dient ein Kanamycin-Resistenzgen auf der T-DNA. Die Selektion auf bakterieller Ebene erfolgt ebenfalls über eine Kanamycin-Resistenz. Es handelt sich jedoch um ein Derivat des pBI121 Vektors (Jefferson *et al.*, 1987), dessen Sequenz bekannt ist (Chen *et al.*, 2003).
- Das Plasmid MS23-LUC (TATA-pBT10-LUC) ist ein Abkömmling des TATA-pBT10-GUS (Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000). Es wurde bei der KWS Saat AG (Dietmar Stahl, persönliche Mitteilung) erstellt. Es verfügt als Selektionsmarker über eine Ampicillin-Resistenz (Amp^r) und enthält ein LUC-Reportergen mit davor geschaltetem Minimalpromotor. Die Vektorsequenz hat eine Länge von 4094 bp und befindet sich im Anhang 8.2..

Die im folgendem aufgeführten Konstrukte wurden von der KWS Saat AG zur Verfügung gestellt (Dietmar Stahl, persönliche Mitteilung). Dabei handelt es sich um Dimere bzw. Tetramere, sowie kombinierte Tetramere von *cis*-Elementen, welche sich zwischen *SpeI*- und *XbaI*-Schnittstelle im pBT10-GUS bzw. -LUC Vektor befinden.

- 2xS_2xD in pBT10-GUS
- 2xS_2xD in pBT10-LUC
- 4xD in pBT10-LUC
- 4x18H_M2_S1 in pBT10-LUC
- 2xD_2x18H_M2_S1 in pBT10-LUC
- 2xD_4x18H_M2_S1 in pBT10-LUC

Bei den vorliegenden klonierten *cis*-Elementen handelt es sich um das S-Element, das D-Element und das 18H_M2_S1-Element. Das D-Element stammt aus dem PR2-Promotor und ist 31 Nukleotide lang (van de Löcht *et al.*, 1990). Das S-Element hat seine Herkunft im ELI7.1-Promotor und eine Länge von 24 Nukleotiden (Kirsch *et al.*, 2000). Das 18H_M2_S1-Element wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht und bei der KWS Saat AG in den pBT10-LUC Vektor umkloniert, bzw. mit dem D-Element in diesem Vektor neu kombiniert.

- Die DNA des *low range*- (Katalognr. #SM0383) sowie *1kb*-(Katalognr. #SM0311/2/3) Marker wurde bei der Firma Invitrogen erworben.
- Alle Bezeichnungen und Katalogisierungsnummern der in dieser Arbeit erstellten DNA-Konstrukte befinden sich im Anhang 8.3..

2.1.10. Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden bei den Firmen Invitrogen und Operon bestellt (Anhang 8.3.):

- Primer GUS_75<: Oligonukleotid, 19mer, 100pmol/μl
5' GCGATCCAGACTGAATGCC 3'
- Primer MS23_Insert_left: Oligonukleotid, 20mer, 100pmol/μl
5' TTCATTAATGCAGCGGATCA 3'
- Primer MS23_Insert_right: Oligonukleotid, 20mer, 100pmol/μl
5' GGTTTCTACAGGACGGACCA 3'
- Primer MS_23_left_HindIII_new: Oligonukleotid, 30mer, 100pmol/μl
5' TAGCAAGCTTGAATTCGGCGCGCCACTAGT 3'
- Primer MS_23_right_BamHI: Oligonukleotid, 26mer, 100pmol/μl
5' TTGGATCCGGTGGCCACTCGAGCGTG 3'
- Primer pBIN_left: Oligonukleotid, 20mer, 100pmol/μl
5' TGTGAAATTGTGAGCGGATA 3'
- Primer pBIN_right: Oligonukleotid, 22mer, 100pmol/μl
5' CAGGACGTAACATAAGGGACTG 3'

Die im folgendem aufgeführten Oligonukleotide wurden in dieser Arbeit für die funktionelle Analyse von *cis*-Elementen verwendet und bei der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Die Syntheseprodukte wurden dort am 5' Ende phosphoryliert und per HPLC aufgereinigt:

- 3C_M1_S1_1: Oligonukleotid, 32-mer, HPLC gereinigt, 1μg/μl
5' [Phos]ctagtTTTGATACGGTTACGGTTAATTAACGt 3'
- 3C_M1_S1_2: Oligonukleotid, 32-mer, HPLC gereinigt, 1μg/μl
5' [Phos]ctagaCGTTAATTAACCGTAACCGTATCAAAa 3';
- 12c_M1_S1_1: Oligonukleotid, 34-mer, HPLC gereinigt, 1μg/μl
5' [Phos]ctagtTCTACTAGAGGCCCATTAGGACCGGCATt 3'
- 12c_M1_S1_2: Oligonukleotid, 34-mer, HPLC gereinigt, 1μg/μl
5' [Phos]ctagaATGCCGGTCCTAATGGGCCTCTAGTAGAa 3'
- 12EE_M1_S1_1: Oligonukleotid, 32-mer, HPLC gereinigt, 1μg/μl
5' [Phos]ctagtTAGGTTCTGCCCTCTCCGTTCTCCT 3'
- 12EE_M1_S1_2: Oligonukleotid, 32-mer, HPLC gereinigt, 1μg/μl
5' [Phos]ctagaGGAGGAACGGAGAGGGCAGGAACCTAa 3'
- 12EE_M1_S2_1: Oligonukleotid, 32-mer, HPLC gereinigt, 1μg/μl
5' [Phos]ctagtTCGAAACCAACCCTCTCCCTTATAAA 3'

- 12EE_M1_S2_2: Oligonukleotid, 32-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagaTTTATAAGGGAGAGGGTTGGTTTCGAa 3'
- 12r_M1_S1_1: Oligonukleotid, 32-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagtCAATCTACTCGTCTCTTCTCTTACATt 3'
- 12r_M1_S1_2: Oligonukleotid, 32-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagaATGTAAGAGAAGAGACGAGTAGATTGa 3'
- 15AAA_M1_S1_1: Oligonukleotid, 31-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagtGACTTTTGACCTAAACCATTTCCATt 3'
- 15AAA_M1_S1_2: Oligonukleotid, 31-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagaATGGAAATGGTTTAGGTCAAAGTCa 3'
- 15CCC_M1_S1_1: Oligonukleotid, 31-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagtCACACACGTGTACTAGGTCAAACCAAt 3'
- 15CCC_M1_S1_2: Oligonukleotid, 31-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagaTGGTTTGACCTAGTACACGTGTGTGa 3'
- 18H_M2_S1_1: Oligonukleotid, 32-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagtCAACACAAAACGCAAACGCAGACCTCt 3'
- 18H_M2_S1_2: Oligonukleotid, 32-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagaGAGGTCTGCGTTTGCGTTTTGTGTTGa 3'
- 20a_M1_S1_1: Oligonukleotid, 32-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagtTTAGAAGTGGCTCGAGTGTCTACTTt 3'
- 20a_M1_S1_2: Oligonukleotid, 32-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagaAAGTAGAACACTCGAGCCACTTCTAAa 3'
- 21S_M1_S1_1: Oligonukleotid, 32-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagtAAGCGATGTTTACGAACCCCAAATCt 3'
- 21S_M1_S1_2: Oligonukleotid, 32-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagaGATTTTGGGGTTCGTAAACATCGCTTa 3'
- 22AAA_M1_S1_1: Oligonukleotid, 31-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagtTTTTTCTCGTCCCCATCCTCTATCCt 3'
- 22AAA_M1_S1_2: Oligonukleotid, 31-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagaGGATAGAGGATGGGGACGAGAAAAAa 3'
- 24F_M1_S1_1: Oligonukleotid, 31-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagtTCATCAATGTGACATAAGCAAAGCTt 3'
- 24F_M1_S1_2: Oligonukleotid, 31-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagaAGCTTTGCTTATGTCACATTGATGAa 3'

- 30A-8_M1_S1_1: Oligonukleotid, 32-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagtGCAAACCTAACGCCGGCGGCCGTCTTGt 3'
- 30A-8_M1_S1_2: Oligonukleotid, 32-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagaCAAGACGGCCGCGCGGCGTTAGTTTGCa 3'
- 30I-8_M1_S1_1: Oligonukleotid, 31-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagtACAACAGACGACTTTTCATAATTCA 3'
- 30I-8_M1_S1_2: Oligonukleotid, 31-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagaTGAATTATGAAAAGTCGTCTGTTGTa 3'
- 30I-8_M1_S2_1: Oligonukleotid, 31-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagtCTATATGACAAAAGTCAAACATAAA 3'
- 30I-8_M1_S2_2: Oligonukleotid, 31-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagaTTTATGTTTGACTTTTGTCATATAGa 3'
- 37C_M1_S1_1: Oligonukleotid, 31-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagtAGAAAAATATTGGGCCTACTGGGA 3'
- 37C_M1_S1_2: Oligonukleotid, 31-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagaTTCCCAGTAGGCCCAATATTTTCTa 3'
- 37E_M1_S1_1: Oligonukleotid, 30-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagtCGATAAACTTGCGAAACCCTAAAA 3'
- 37E_M1_S1_2: Oligonukleotid, 30-mer, HPLC gereinigt, 1µg/µl
5' [Phos]ctagaTTTTAGGGTTTCGCAAGTTTATCGa 3'

2.1.11. Bakterienstämme

Escherichia coli

Für die Arbeiten mit *E. coli* kamen Zellen des Stammes XL1-Blue MRF' zum Einsatz (Stratagene, #200301). Diese können mit Tetracyclin selektiert werden.

Agrobacterium tumefaciens

Zur Transformation von *A. tumefaciens* wurde der Stamm C58C1 pGV2260 (Deblaer *et al.*, 1985) verwendet. Dieser kann mit Rifampicin und Carbenicillin selektiert werden.

2.1.12. Antibiotika

Es wurden die Antibiotika Carbenicillin und Tetracyclin der Firma Duchefa verwendet. Von beiden Antibiotika wurden Stammlösungen (Carbenicillin, 100mg/ml; Tetracyclin, 12,5mg/ml) hergestellt und sterilfiltriert.

2.1.13. Petersilien-Zellkultur

Zur Gewinnung von pflanzlichen Protoplasten wurde eine sterile Petersilien-Kallus-Zellkultur (Pc 5/3, Imre Somssich, persönliche Mitteilung) verwendet. Diese wurde in 40ml HA-Medium im Dunkeln bei 25°C unter Schütteln (ca. 100rpm) kultiviert. Nach 7 Tagen wurden zur Weiterkultivierung 10ml der Zellkultur durch steriles Überführen in ein 100ml Weithals-Kolben mit 40ml HA-Medium umgesetzt. Zur Herstellung von Protoplasten wurden nach fünf Tagen die Zellen abzentrifugiert und wie unter 2.4. beschrieben weiter verfahren.

2.1.14. Pflanzenmaterial

Arabidopsis Wildtyp (Col-0) Samen wurden zunächst sterilisiert und ca. 5 Samen auf ½ MS-Platten ausgelegt. Nach drei Tagen Stratifikation wurden die gekeimten Samen unter Kurztagbedingungen (10 Stunden Licht, 14 Stunden Dunkelheit, 24,8°C) bis zum 8-Blatt-Stadium der Pflanzen herangezogen.

2.2. Methoden

2.2.1. Plasmidminipräparation

Ein *E.coli* Stamm mit dem gewünschten Plasmid wurde über Nacht in 4ml LB-Medium mit Antibiotikum (Carbenicillin, 1/1000) angezogen. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C im Schüttler. 1,5ml der Kultur wurden für 20sec bei 10.000xg zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 100µl kalter Zellsuspensionslösung durch fünfminütiges Schütteln resuspendiert. Es

wurden 200µl Denaturierungslösung dazu gegeben und die Suspension wurde fünfmal vorsichtig invertiert. Es folgte eine Inkubation für 5 Minuten auf Eis. Die Reaktion wurde durch Beigabe von 150µl kalter Renaturierungslösung durch sofortiges, vorsichtiges 10maliges Invertieren abgestoppt und noch einmal für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die behandelten Zellen bei 10.000xg für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine Zugabe von einem Volumen Phenol/Chloroform. Der Ansatz wurde gut gemischt. Dabei entstand eine milchige Emulsion. Zur Trennung der Phasen folgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 10.000xg. Danach wurde die wässrige Oberphase abgenommen und die Nukleinsäure mit Alkohol präzipitiert und gewaschen. Dafür wurden 2 Volumen 96% kaltes Ethanol hinzu gegeben. Nach Durchmischung folgte eine Inkubation von 2 Minuten. Dann wurde eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 10.000xg bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und es folgte ein Waschschriff mit einem Volumen 70% Ethanol. Nach einem kurzen Anzentrifugieren wurde der Überstand vollständig entfernt und das Pellet für 10 Minuten bei 37°C getrocknet. Das Pellet wurde in 20µl LTE-Puffer gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Gelelektrophorese (2.2.3.) und dem Einsatz eines DNA-Längenstandards in bekannter Konzentration.

2.2.2. Plasmidmaxipräparation

Ein *E.coli* Stamm mit dem gewünschten Plasmid wurde über Nacht in 4ml LB-Medium mit Antibiotikum (Carbenicillin, 1/1000) angezogen. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C im Schüttler. Nach 5-6 Stunden wurden diese Vorkulturen in sterile 400ml LB-Medium mit Antibiotikum (Carbenicillin, 1/1000) in Weithals-Erlenmeyerkolben überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C im Schüttler für ca. 16 Stunden. Am nächsten Morgen wurde der Inhalt der Kolben in Zentrifugenbecher überführt und bei 4000rpm für 20min zentrifugiert (RC-5B, Sorvall). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50ml kalter Lösung 1 resuspendiert. Danach wurden je Extraktion 4ml Lysozymlösung hinzu gegeben und der Ansatz für 10min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 50ml Lösung 2. Der Zentrifugenbecher wurde

zur Durchmischung vorsichtig geschwenkt und invertiert. Eine 5minütige Inkubation auf Eis schloss sich an. Danach wurden 50ml Lösung 3 hinzu pipettiert, erneut vorsichtig gemischt und 30min auf Eis inkubiert. In einer vorgekühlten (4°C) Zentrifuge wurden bei 5000rpm die Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde nach Filtration in einen neuen Zentrifugenbecher überführt. Es folgte der Zusatz von 100ml Isopropanol, um die DNA zu fällen. Dieser Ansatz wurde für mindestens 20min bei Raumtemperatur belassen. Danach wurde bei 5000rpm und 4°C für 30min zentrifugiert. Das Pellet wurde nun für eine Stunde im Zentrifugenbecher bei 37°C getrocknet. Eine Resuspendierung der DNA erfolgte durch Zugabe von zunächst 3ml TE-Puffer und Überführung in ein 15ml Falcongefäß. Der Zentrifugenbecher wurde nochmals mit 1ml TE-Puffer nachgespült und dieser ml wurde ebenfalls überführt. Die DNA konnte bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden. Durch Zugabe von 4ml eines Phenol/Chloroform-Gemisches wurden die enthaltenen Proteine durch Vortexen gemischt und denaturiert. Daran an schloss sich eine Zentrifugation bei 3750rpm für 15min (GS-6KR, Beckmann). Die obere Phase wurde in ein neues Falcongefäß überführt. Es folgte die Zugabe von 1/10 (= 400µl) 3M Natriumacetat und 2 Volumen (= 8ml) 96% Ethanol. Eine Fällung fand für mindestens 2 Stunden bei -20°C statt. Danach wurde die Lösung für 15min bei 3750rpm und 4°C zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit 8ml 70% Ethanol bei den gleichen Zentrifugationsbedingungen für 5min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde im umgedrehten Falcongefäß für ca. 1 Stunde bei 37°C getrocknet. Zum Lösen der DNA wurden 500µl LTE auf das Pellet gegeben. Die gelöste DNA wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und wurde bei -20°C gelagert. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Gelelektrophorese (2.2.3.) und dem Einsatz eines DNA-Längenstandards in bekannter Konzentration.

2.2.3. Agarosegelelektrophorese

Agarose wurde durch mehrfaches Aufkochen in 1x TAE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60°C 1/10000 Volumen Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzu gegeben. Die abgekühlte Lösung wurde in den Gelträger der Elektrophoresekammer gegossen. Dazu werden horizontale

Flachbettapparaturen benutzt. Zur Ausformung von Taschen wurde ein geeigneter Kamm eingesetzt, der nach Erstarren und Übersichten des Gels mit Puffer entfernt wurde. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 10% 10xLadepuffer versetzt. Anhand eines mitgeführten DNA-Längenstandards bei einer Elektrophorese, z. B. 1kb-Marker, kann die Länge und Konzentration eines aufgetrennten Fragmentes bestimmt werden. Die Auftrennung erfolgte in einem 1- 2%igen (w/v) Agarosegel in 1x TAE-Puffer bei einer Spannung zwischen 60- 100 Volt (je nach Gelgröße/Apparatur) für ein bis zwei Stunden. Zur Detektion der DNA wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator (Biorad) mit Licht der Wellenlänge 254 nm durchstrahlt.

2.2.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die weitere Verwendung von Fragmenten, die in einem Agarosegel aufgetrennt wurden, ist es notwendig, diese aus der Gelmatrix zu eluieren. Dazu wurde die zu verwendende DNA-Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht knapp ausgeschnitten. Der Agaroseblock wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und das Gel-Gewicht bestimmt (100 mg = 100µl). Für die folgenden Arbeitsschritte wurde das Kit NucleoSpin® ExtractII (Machery-Nagel) verwendet. Es wurde das doppelte Volumen an NT-Puffer zu dem Gelblockgewicht hinzu gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 50°C unter gelegentlichem Vortexen, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Die Lösung wurde auf eine NucleoSpin® ExtractII-Säule geladen. Der Durchfluss wurde nach einminütiger Zentrifugation bei 11.000xg verworfen. Anschließend erfolgte ein Waschschrift der Säule mit 600µl NT3-Puffer bei einminütiger Zentrifugation (11.000xg; Raumtemperatur). Dieser Schritt wurde mit einer 2minütigen Zentrifugation ohne Pufferzugabe wiederholt, um die Säule zu trocknen. Zur vollständigen Trocknung der Säulenmembran wurde diese offen für fünf Minuten in einen 37°C Wärmeschrank gestellt, um ein Abdampfen der Ethanolreste zu ermöglichen. Im letzten Schritt wurden 30µl Elutions-Puffer NE in die Mitte der Säulenmembran pipettiert und zur höheren DNA-Ausbeute die Säule fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Mit einer einminütigen Zentrifugation bei 11.000xg wurde die DNA von der Säule eluiert. Anschließend fand eine Konzentrationsbestimmung (2.2.3.) mittels Agarosegelelektrophorese und eines Längenstandards statt.

2.2.5. Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

Fünf Milliliter dyt-Medium (Tetracyclin, 1/1000) wurden mit einer Einzelkolonie der XL1-Blue MRF'-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler angezogen. Nach ca. 16 Stunden Wachstum wurde diese Vorkultur in vorgewärmte 400ml dyt-Medium überführt und bis zu einer $OD_{600}=0,5-0,8$ (Dauer ca. drei Stunden) angezogen. Die Kultur wurde dann 30 Minuten auf Eis gestellt und auch alle weiteren Schritte fanden bei 4°C statt. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 4000xg pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 400ml 10% Glycerin (eiskalt) resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 4000xg. Das Pellet wurde im Anschluss in 250ml 10% Glycerin resuspendiert. Wieder erfolgte eine Zentrifugation bei 4000xg und eine Resuspendierung des Pellets in 20ml 10% Glycerin. Ein letzter Zentrifugenschritt bei 4000xg und die Resuspendierung des Pellets in 1ml 10% Glycerin schloss sich an. Im Anschluss fand eine Aliquotierung von 40µl elektrokompetenter Zellen in Eppendorfgefäße statt. Diese Aliquots wurden bei -70°C gelagert.

2.2.6. Transformation von *E. coli*

40µl tiefgefrorene elektrokompetente *E. coli* Zellen (2.2.5.) wurden auf Eis aufgetaut. Eine Küvette (0,2 cm Elektrodenabstand) und der zu transformierende gereinigte Ligationsansatz wurden auf Eis gekühlt. Das SOC-Medium wurde auf Raumtemperatur erwärmt. 3-6µl der DNA (ca. 10-20ng) wurden mit den kompetenten Zellen gemischt und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte die Überführung in die eisgekühlte Küvette. Die Suspension befand sich luftblasenfrei am Boden der Küvette. Die trockene Küvette wurde in den Schieber des Elektroporators gestellt und ein elektrischer Puls von 2,5 kV ausgelöst (fest eingestellt: 200 Ω, Kapazität 25µF). Unmittelbar danach wurde zu den Zellen 500µl SOC-Medium gegeben. Diese Zellen wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und zur Regeneration für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Verschiedene Verdünnungen der transformierten Zellen wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum (1/1000 Carbenicillin) über Nacht kultiviert.

2.2.7. Restriktionsspaltungen, Dephosphorylierung und Ligation

Alle rekombinanten DNA-Techniken wurden nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989) bzw. nach den Herstellerangaben, von denen die entsprechenden Enzyme erworben wurden, durchgeführt.

In der Regel wurden Restriktionsspaltungen mit DNA-Mengen von ca. 1 µg in entsprechenden Reaktionspuffern der Hersteller durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 1- 4 Stunden oder über Nacht bei 37°C im Wasserbad.

Für eine Dephosphorylierung wurde 1 µl des Enzyms CIAP zu einem 10 µl-Restriktionsansatz gegeben. Eine Deaktivierung des Enzyms wurde durch eine 10minütige Hitzeeinwirkung bei 75°C im Wasserbad erreicht. Dieser Ansatz wurde mit dem NucleoSpin® ExtractII-Kit aufgereinigt, welches zur Entfernung von Enzymen in DNA-Lösungen und Reinigung von PCR-Ansätzen geeignet ist. Dabei wurde den Anweisungen des Herstellers gefolgt (2.2.4.).

Für Ligationen wurde das Insert im 3fachen molaren Überschuss im Verhältnis zum Vektor eingesetzt. Der Vektor lag in einer Konzentration von 50 ng/µl vor. Die Inkubation erfolgte in der Regel über Nacht bei 14°C. Es folgte eine Aufreinigung des Ligationsansatzes vor der Elektroporation. Die ligierte DNA wurde dafür mit 80 µl sterilem ddH₂O aufgefüllt und mit 10 µl 3M Natriumacetat pH 5,2 versetzt. Im Anschluss wurden 100 µl Phenol/Chloroform hinzu gegeben und der Ansatz wurde gevortext. Es folgte eine Zentrifugation für 2 Minuten bei 10.000xg (Biofuge pico, Heraeus). Der wässrige Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 1 µl Glycogen versetzt. Zur Fällung der DNA wurden dann 200 µl kaltes 96% Ethanol hinzu pipettiert und die Lösung für 30 Minuten bei -20°C weggefroren. Es folgte eine 30minütige Zentrifugation bei 17.000rpm (Biofuge 22R, Heraeus) und 4°C. Das Pellet wurde dreimal mit 200 µl kaltem 70% Ethanol gewaschen. Hierbei wurde jeweils zehn Minuten bei 17.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zwischendurch verworfen und am Ende vollständig abgenommen. Das DNA-Pellet wurde vollständig getrocknet und in 15 µl sterilem ddH₂O aufgenommen.

2.2.8. Annealing ssDNA zu dsDNA

Zur Herstellung doppelsträngiger DNA aus jeweils gleichen Mengen komplementären, einzelsträngigen Oligonukleotiden wurden diese in einer Konzentration von 1 µg/µl zunächst in LTE gelöst. In einem 1:1 Verhältnis wurden diese DNA-Lösungen anschließend in einem Eppendorfgefäß vorsichtig gemischt. Das Annealen erfolgte im Heizblock, der auf 95°C vorgewärmt wurde. Nach 10minütiger Inkubation bei 95°C wurde der Heizblock ausgestellt und die dsDNA wurde somit langsam heruntergekühlt (mindestens 6 Stunden). Sie stand nun für Klonierungen zur Verfügung oder wurde bei -20°C gelagert.

2.2.9. Polymerasekettenreaktion

Ein 25 µl-PCR-Ansatz enthält folgende Bestandteile:

2,5 µl	10x PCR-Puffer
0,5 µl	dNTPs (jeweils 10 mM)
1,0 µl	Forward Primer (20 pmol/µl)
1,0 µl	Reverse Primer (20 pmol/µl)
0,1 µl	DNA-Polymerase (5 U/µl)
1 µl	DNA-Template
18,9 µl	H ₂ O _{bidest.}
<hr/> 25 µl	

Die Proben wurden in den Thermocycler gestellt und das gewünschte Programm gestartet. Tabelle 6 zeigt den Ablauf eines PCR-Standardprogrammes.

Tabelle 6: Ablauf eines Standard PCR-Programmes. Je nach Primer und Template variiert das Programm in Annealingtemperatur und Vervielfältigungszeit.

Arbeitsschritt	Temperatur und Dauer
Initiale Denaturierung	2 Minuten; 94°C
30 Zyklen zur Vervielfältigung	Je Zyklus: <ul style="list-style-type: none"> - 30 sec; 94°C - 30 sec.; 55°C - 1,30 min; 72°C
Finale Elongation	5 Minuten; 72°C

Die Annealingtemperatur der einzelnen Primer wurde an die jeweilige Reaktion angepasst. Sie liegt 3-5°C unter der errechneten Schmelztemperatur der Primer. Die Schmelztemperatur (T_m) lässt sich für Primer mit einer Gesamtlänge von unter 30bp nach folgender Formel berechnen:

$$T_m = 69,3 + 0,41 \times (\text{GC}\%) - 650 / (\text{Länge des Primers in bp})$$

Die Elongationszeit wurde mit der Templategröße abgeglichen. Es wurde davon ausgegangen, dass eine Polymerase ca. 1kb DNA pro Minute synthetisiert.

2.2.10. **Aufreinigung von PCR-Fragmenten**

Zur Aufreinigung von amplifizierten PCR-Fragmenten wurde den Herstelleranweisungen des NucleoSpin® ExtractII Kits gefolgt (2.2.4.).

2.2.11. **Sequenzierung und computergestützte Auswertung**

Die Mehrzahl der Sequenzierungen wurde am Institut für Mikrobiologie der TU-Braunschweig durchgeführt. Das Sequenziergerät war der ABI Prism® 310 *Genetic Analyzer*. Dafür musste die zu sequenzierende DNA zunächst mit Fluoreszenz-markierten dNTPs in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden. Für eine solche PCR-Reaktion wurden folgende Bestandteile zusammen pipettiert:

2µl	10x PCR-Puffer
2µl	ABI-Premix
1µl	Sequenzier-Primer (10 pmol/µl)
1-5µl	DNA-Template
xµl	H ₂ O _{bidest.}
<hr/>	
10µl	

Bei Plasmiden wurde ca. 1µg, bei PCR-Produkten ca. 30 ng DNA eingesetzt.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Tabelle 7: Ablauf des Sequenzierungs-PCR Programmes Netti5.

Arbeitsschritt	Temperatur und Dauer
Initiale Denaturierung	1 Minute; 96°C
25 Zyklen zur Vervielfältigung	Je Zyklus: 30 sec; 96°C 15 sec.; 50°C 4 min; 60°C

Zur Aufreinigung der Sequenzierreaktion wurde diese im Anschluss mit 90µl sterilen ddH₂O versetzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zusatz von 10µl 3M Natriumacetat, 250µl 96% Ethanol und 1µl Glycogen. Es folgte eine Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation bei 11.000g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet wurde zwei Mal mit dem gleichen Volumen 70% Ethanol gewaschen. Diese Schritte wurden für fünf min bei 11.000g und 4°C durchgeführt. Das Pellet wurde nach Dekantierung der Überstände in der Speed-Vac vollständig getrocknet und in 12,5µl denaturierenden Agenz (Hidi) resuspendiert. Diese Lösung wurde dann luftblasenfrei in ein Sequenziergefäß überführt und am Sequenzierer analysiert.

Alle übrigen DNA-Sequenzierungen wurden bei der Firma GATC Biotech durchgeführt. Dafür wurden Plasmid-DNA in einer Konzentration zwischen 30-100 ng/µl und ein entsprechender Primer mit einer Konzentration von 10pmol/µl an das Unternehmen gesandt.

Eine Auswertung der DNA-Sequenzen wurde mit der freien Software Chromas durchgeführt (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html).

2.3. Herstellung von Promoter-Reportergen-Konstrukten

Die bei der Firma Operon bestellten Oligonukleotide (2.1.10.), welche bioinformatisch vorausgesagte, potentiell Pathogen-responsive regulatorische Sequenzen darstellen, enthielten am *forward*- und am *reverse*-Strang Linkersequenzen, die für eine Klonierung notwendig waren. Das Oligonukleotid, welches später den *forward*-Strang darstellen sollte, trug am 5' Ende die Sequenz 5' ctagt 3' (*SpeI*-Linkersequenz) und am 3' Ende ein zusätzliches Thymin. Das entsprechende Oligonukleotid für den *reverse*-Strang war am 5' Ende mit der Sequenz 5' ctaga 3' (*XbaI*-Linkersequenz) und am 3' Ende mit einem zusätzlichen Adenin versehen. Zur Klonierung der annealten ds-Oligonukleotide (2.2.8.) wurde der pBT10-Vektor mit GUS-Reportergen benutzt (2.1.9.). Dieser wurde mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *XbaI* verdaut (2.2.7.), dephosphoryliert (2.2.7.) und mittels Kit aufgereinigt (2.2.4.). Die ds-Oligonukleotide werden in 3fachen molaren Überschuss im Verhältnis zum Vektor in einer Ligation (2.2.7.) eingesetzt.

Die Ligationen wurden aufgereinigt und in *E. coli* transformiert (2.2.6.). Am nächsten Tag wurden Einzelkolonien für die Mini-DNA-Extraktion vorbereitet, über Nacht kultiviert und am nächsten Tag die DNA isoliert (2.2.1.). Zur Überprüfung einer erfolgreichen Ligation wurde eine PCR (2.2.9.) mit den Primer MS23_Insert_left und GUS_75 durchgeführt (Anhang 8.3.). Als Kontrollen diente DNA des TATA-pBT10-GUS Konstrukts mit Minimalpromotor und das 2xS_2xD-GUS Konstrukt, welches 4x ein Insert beinhaltete. Aufgrund des Größenunterschiedes konnten Konstrukte mit einem, zwei oder vier Inserts unterschieden werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Überprüfung der korrekten Orientierung des Inserts wurde eine PCR mit allen 1x-Klonen durchgeführt. Hierbei wurden jeweils in einer *forward*-PCR bzw. einer *reverse*-PCR die ursprünglichen ss-Oligonukleotide mit dem GUS_75 als Primer verwendet und entsprechend verdünnt. Ergab die *forward*-PCR ein Amplifikat, so war das Insert in dieser Orientierung vorhanden. Wurde hingegen ein Amplifikat in der *reverse*-PCR gebildet, war das Insert gegenläufiger Orientierung im Vektor vorhanden. Die *forward* orientierten 1xKlone wurden zur Überprüfung sequenziert (2.2.11.). Von den *forward* 1x-Klonen wurden 6µl der extrahierten DNA in Ansatz A mit *SpeI/SacI* verdaut und in Ansatz B 6µl der DNA mit *XbaI/SacI* verdaut (2.2.7.).

Wie das Schema in Abbildung 16 verdeutlicht, wurden durch die Restriktionsspaltungen zwei verschiedene Hälften des Vektors erhalten, die jedoch beide Male ein Insert erhalten.

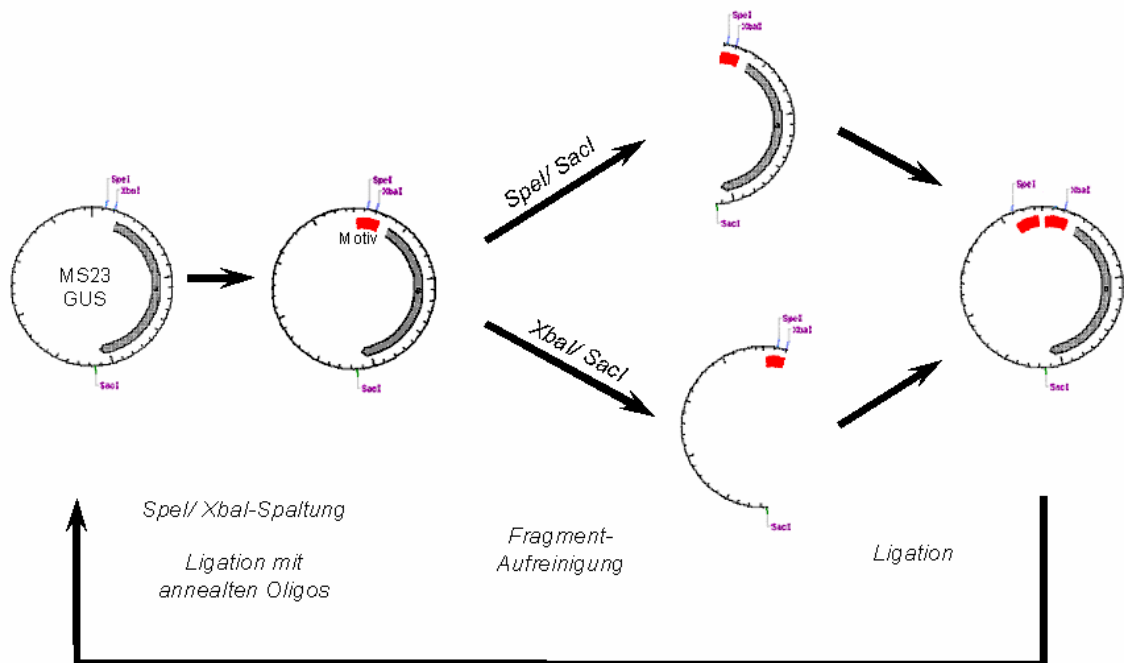


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie. Der Vektor pBT10-GUS wurde mit *SpeI* und *XbaI* enzymatisch verdaut, dephosphoryliert und aufgereinigt. Die annealten Oligonukleotide besaßen an ihren 5'- bzw. 3'-Enden die entsprechenden Linkersequenzen für eine Ligation in den pBT10-Vektor. Nach der Ligation lag das annealte Oligonukleotid (Motiv, rot) vor dem GUS-Reportergen. Nach zwei unterschiedlichen Verdauen wurden die zwei verschiedenen Bereiche des Vektors, die beide eine Motivsequenz trugen wieder zusammen ligiert und der Vektor enthielt zwei Inserts des Motivs. Dieser Vorgang wurde wiederholt, um eine vierfache Kopie des Motivs im Vektor zu erhalten.

Die Verdauungen wurden auf einem 1% Agarosegel für 2 Stunden aufgetrennt. Bei Ansatz A wurde das kleinere Fragment ausgeschnitten und aufgereinigt, bei Ansatz B das größere Fragment. Nach einer Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Fragmente (2.2.4.) wurden diese in einem Verhältnis von 1:1 in eine Ligation eingesetzt (Abbildung 16). Dieser Ligationsansatz wurde erneut gereinigt und in *E. coli* transformiert (2.2.6.). Es folgte die Kontroll-PCR für ein zweimaliges Vorhandensein eines Inserts. Dieser Ablauf mit Restriktionsspaltung, Gelelektrophorese, Aufreinigung der Fragmente und Ligation mit Transformation und Test-PCR wurde ebenfalls für die Erstellung von 4x-Konstrukten wiederholt. Die klonierten Tetramere der zu analysierenden

potentiellen *cis*-Elemente vor dem GUS-Reportergen im pBT10-Vektor wurden zur Überprüfung sequenziert (Anhang 8.4.). Für die folgenden Versuche wurde die DNA im großen Volumen extrahiert (2.2.2.). Anschließend fand eine Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegelelektrophorese und eines Längenstandards statt.

Es wurden insgesamt 17 Reportergen-Konstrukte erstellt, die ein Tetramer der ausgewählten Einzelsequenzen enthielten. Die in dieser Arbeit diskutierten Konstrukte wurden von unterschiedlichen Experimentatoren erstellt und sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Auflistung der in dieser Arbeit ausgewählten Einzelsequenzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde alle mit ‚Jeannette Kappler‘ bezeichneten Konstrukte erstellt, im Rahmen der Doktorarbeit von Julia Niemeyer (persönliche Mitteilung) wurde alle mit ‚Julia Niemeyer‘ eingeteilten Konstrukte erstellt. Im Rahmen seiner Bachelorarbeit fertigte Fabian Wippich zwei Konstrukte an, die mit ‚Fabian Wippich‘ bezeichnet wurden.

Bezeichnung	Klonierungsexperimentator(in)
3C_M1_S1	Jeannette Kappler
12c_M1_S1	Jeannette Kappler
12EE_M1_S1	Julia Niemeyer
12EE_M1_S2	Julia Niemeyer
12r_M1_S1	Jeannette Kappler
15AAA_M1_S1	Julia Niemeyer
15CCC_M1_S1	Julia Niemeyer
18H_M2_S1	Jeannette Kappler
20a_M1_S1	Julia Niemeyer
21S_M1_S1	Jeannette Kappler
22AAA_M1_S1	Fabian Wippich
24F_M1_S1	Fabian Wippich
30A-8_M1_S1	Julia Niemeyer
30I-8_M1_S1	Julia Niemeyer
30I-8_M1_S2	Julia Niemeyer
37C_M1_S1	Jeannette Kappler
37E_M1_S1	Jeannette Kappler

2.4. Petersilien-Protoplasten System

Die transienten Expressionsanalysen zur Überprüfung der Induzierbarkeit vorausgesagter regulatorischer *cis*-Elemente wurden ähnlich wie bei van de Löcht *et al.* (1990) beschrieben durchgeführt.

Abbildung 17 gibt einen Überblick über die Arbeitsschritte. Eine Kalluskultur von Petersilienzellen wurde enzymatisch verdaut. Die freigesetzten Protoplasten (PP) wurden mittels PEG mit Reportergenkonstrukten transformiert. Nach dem Aufteilen eines Ansatzes wurde zu einem Teil ein PAMP (Pep25) hinzu gegeben, zum anderen Teil nicht. Nach 24h erfolgten eine Proteinextraktion und eine Messung der Reportergenaktivität.

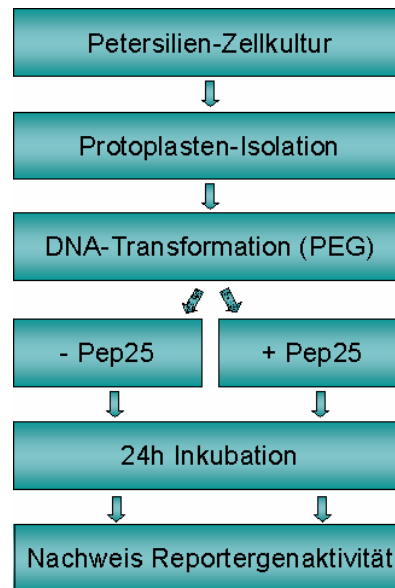


Abbildung 17: Übersicht des transienten Petersilien-Protoplasten Systems. Die Petersilien-Zellkultur (Pc 5/3), welche eine Flüssig-Kalluskultur darstellt, wurde enzymatisch verdaut. Nach Entfernung der Zellwand wurden die PP mittels PEG transformiert und der Ansatz wurde geteilt. Zu einer Hälfte wurde ein PAMP (Pep25) hinzu gegeben, wohingegen die Kontrolle kein PAMP enthielt. Nach 24h wurden die PP geerntet und die Reportergen-Aktivität im Proteinextrakt bestimmt.

2.4.1. Protoplastierung

Ca. 50ml einer fünf Tage alten sterilen Petersilien-Kalluskultur wurde auf zwei 50ml Falcongefäße steril verteilt und fünf Minuten bei 1200rpm bei Raumtemperatur zum Pelletieren der Zellen zentrifugiert (GS-6KR Centrifuge, Beckmann). Der Überstand wurde dekantiert und je Gefäß wurden 15ml Enzymlösung (Petersilie) hinzu gegeben. Der Ansatz wurde mit 0,24M CaCl_2 -Lösung auf 45ml aufgefüllt. Die resuspendierten Zellen in den jeweiligen Falcongefäßen wurden je in eine 15cm (\varnothing) Petrischale überführt. Diese wurde mittels Paraplast steril verschlossen und im Dunkeln bei 10-15rpm für 18 Stunden inkubiert (25°C). Durch die vorliegenden Enzyme Cellulase und

Macerozym werden die Zellwände der Zellen verdaut und Protoplasten (PP) wurden freigesetzt. Am nächsten Tag wurde die Freisetzung der PP unter dem Mikroskop (400fache Vergrößerung) kontrolliert.

2.4.2. Aufreinigung intakter Protoplasten

Die über Nacht verdaute Zellkultur (2.4.1.) wurde für 20 Minuten bei 40-45rpm geschüttelt. Der Inhalt jeder Petrischale wurde mit einer sterilen 2ml Pipette [Sarstedt Kat. #86.1171.010] in ein 50ml Falcongefäß vorsichtig überführt. Die Pipettenspitze besaß eine weite Öffnung, um die Protoplasten nicht zu scheren. Es folgte eine Zentrifugation für 2 Minuten bei 1200rpm (Laborzentrifuge GS-6KR, Beckmann) und Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen. Die pelletierten Protoplasten wurden in ca. 20ml 0,24M CaCl_2 -Lösung aufgenommen und das Pellet vorsichtig vollständig resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation zum Waschen der Zellen bei 1200rpm für 2 Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die Protoplasten wurden diesmal mit 25ml P5-Medium vollständig resuspendiert. Die folgende Zentrifugation bei 1200rpm für 5 Minuten diente dem Flottieren der Protoplasten. Hierbei sammelten sich die intakten Protoplasten aufgrund ihrer Dichte an der Oberfläche des Mediums an. Dieser Ring an Protoplasten wurde mit einer sterilen Einmalpipette abgenommen und in ein neues 50ml Falcongefäß gegeben. Das Gefäß wurde mit P5-Medium auf 45ml aufgefüllt. Der Flottierungsschritt bei 1200rpm für 5 Minuten wurde wiederholt. Dieses mehrmalige Flottieren diente der Reinigung und der Gewinnung von ausschließlich intakten PP, da die nicht intakten PP sich bei jedem Zentrifugationsschritt am Boden des Gefäßes absetzten. Der PP-Ring wurde erneut abgenommen und in ein 15ml Falcongefäß überführt. Mit P5-Medium wurde das Gefäß auf 15ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Wieder folgte ein Zentrifugationsschritt wie oben beschrieben. Der Ring wurde abgenommen und es folgte zum letzten Mal ein Auffüllen mit P5-Medium und anschließender Zentrifugation. Der zum Schluss abgenommene PP-Ring (3-5ml) diente für die folgende Transformation (2.4.3.).

2.4.3. Transformation

Alle folgenden beschriebenen Arbeiten wurden an der Sterilwerkbank durchgeführt. Mit dieser Methode können bis zu 12 Transformationen gleichzeitig durchgeführt werden. 12 15ml Falcongefäße wurden mit -1 bis -12 beschriftet. In jedes Röhrchen wurden 10µg zu transformierende DNA pipettiert. Danach wurden 200µl PEG-Lösung (Petersilie) tropfenweise hinzu pipettiert. Für die Transformation wurden 200µl PP mit einer blauen, abgeschnittenen Pipettenspitze hinzu pipettiert und der Ansatz wurde durch vorsichtiges Schlagen des Röhrchens vermischt. Die eigentliche Transformation fand dann für ca. 20 Minuten im Dunkeln statt. Im Anschluss wurde zum Abstoppen der Reaktion tropfenweise 1ml Calciumnitrat-Lösung langsam hinzu gegeben. Danach wurden 4ml Calciumnitrat-Lösung dazu pipettiert. Die Röhrchen wurden zur vollständigen Durchmischung und Abstopfung zweimal invertiert und danach für 7 Minuten bei 800rpm zentrifugiert (Laborzentrifuge GS-6KR, Beckmann). Der Überstand wurde verworfen und in jedes Röhrchen wurden 6ml P5-Medium hinzu geben.

Parallel wurden 12 Röhrchen mit +1 bis +12 beschriftet. Das Plus gibt hierbei an, dass in diesen Ansätzen ein PAMP hinzu geben wurde. Folglich wurde in diese Röhrchen eine entsprechende Verdünnung der zu untersuchenden PAMPs/Signalsubstanzen (Pep25 [Endkonzentration: 300ng/ml], Flg22 [Endkonzentration: 1µM], AtPep1 [Endkonzentration: 2nM], AtPep2 [Endkonzentration: 2nM], MJ [Endkonzentration 10^{-5} - 10^{-8} M], SA [Endkonzentration 10^{-7} - 10^{-10} M]) pipettiert. Nach kurzem Invertieren wurden je 3,2ml der transformierten PP aus den Minusröhrchen (z. B. -1) in das entsprechende Plusöhrchen (+1) überführt. In jedem Röhrchen (Plus und Minus) befand sich annähernd die gleiche Menge an PP. Es folgte eine Inkubation der Röhrchen liegend für 24 Stunden bei 25°C.

2.4.4. Ernte der transformierten Protoplasten

Pro Röhrchen wurden 9ml 0,24M CaCl_2 -Lösung dazu geben. Die Röhrchen wurden invertiert und bei 2500rpm für 10 Minuten zentrifugiert (Laborzentrifuge GS-6KR, Beckmann). Der Überstand wurde mithilfe einer

Wasserstrahlpumpe bis auf ein Restvolumen von ca. 1ml abgesaugt. Die pelletierten PP wurden in diesem Restvolumen resuspendiert und in beschriftete Eppendorfgefäße mittels abgeschnittener, blauer Spitzen überführt. Diese befüllten Eppendorfgefäße wurden für 15sec bei 11.000xg zentrifugiert (Biofuge Pico, Heraeus). Der Überstand wurde vollständig mithilfe der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die PP in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden sie bei -70°C gelagert.

2.5. *Arabidopsis*-Protoplasten System

2.5.1. Protoplastierung

Die Blätter von 4-6 Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen (2.1.14.) wurden mit einem sterilen Skalpell in einer Petrischale in ca. 5mm x 5mm große Blattstückchen zerteilt und in 14ml Enzymlösung (*Arabidopsis*) gegeben. Der Verdau wurde über Nacht bei 25 °C im Dunkeln ohne Schütteln durchgeführt. Alle Schritte wurden mit abgeschnittenen Spitzen oder sterilen Transferpipetten vollzogen.

2.5.2. Aufreinigung intakter Protoplasten

Für die Aufreinigung der Protoplasten wurden die verdauten Blättchen in der Enzymlösung durch einen sterilen Nylon-Filter (Porengröße 60µm) gegeben. Die Blattstücke wurden 2x mit 6-10ml W5-Puffer gespült und noch einmal durch den zuvor verwendeten Filter gegeben. Die Durchflüsse wurden gemischt und auf vier sterile Glasröhrchen verteilt. In der Zentrifuge mit schwach eingestellter Bremse wurden die freigesetzten PP für fünf min bei 800rpm vorsichtig pelletiert (Laborzentrifuge GS-6KR, Beckmann).

Der Überstand wurde bis auf 1 bis 2ml abgenommen und das Pellet wurde in dieser Flüssigkeit resuspendiert. Diese PP-Lösung wurde auf 4x 7ml 21% (w/v) sterile Saccharose-Lösung geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation für fünf min bei 800rpm (Laborzentrifuge GS-6KR, Beckmann). Der oben flottierende Ring an intakten, grünen PP wurde jeweils abgenommen in ein

neues Glasröhrchen überführt. Es wurden anschließend 8-10ml W5-Puffer dazu gegeben und für fünf min bei 800rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 1ml verworfen und das Pellet in dieser W5-Menge resuspendiert. Der Inhalt aller vier Röhrchen wurde vereinigt und mit W5-Puffer auf ca. 10ml aufgefüllt. Zum erneuten Pelletieren der PP wurde bei diesem Waschschrift für 5 min bei 800rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen bis auf 1ml, das Pellet wurde resuspendiert und Mannit-Medium wurde zugegeben bis zu einer Dichte von 5×10^6 Protoplasten/ml.

2.5.3. Transformation

500µl PP-Suspension wurden in sterile Glasröhrchen vorgelegt. Es folgte für fünf min bei 42°C im Wasserbad ein Hitzeschock. Danach wurden die PP für 30 sec auf Eis abgekühlt und bei Raumtemperatur steril 30µl der jeweiligen zu transformierenden DNA (0,5µg/µl) zugegeben. Unter leichtem Schütteln wurden 530µl PEG-Lösung (*Arabidopsis*) durch langsames Tropfen und gleichzeitiges Mischen je Ansatz zugegeben. Für die Transformation ergab sich eine 20minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Ansätze wurden dabei ab und zu leicht geschüttelt.

Die Transformation wurde durch langsame, tropfenweise Zugabe von 10ml W5 und gleichzeitigem Mischen abgestoppt. Danach folgten 8 min Zentrifugation bei 800rpm (Laborzentrifuge GS-6KR, Beckmann). Der Überstand wurde bis auf ca. 500µl abgenommen und das Pellet sofort in dieser Lösung resuspendiert. Anschließend wurden 6ml B5-Medium zugegeben. Diese PP-Lösung wurde gleichmäßig auf zwei 15ml Falcongefäße verteilt, von denen eins den zu untersuchenden PAMP bzw. Signalsubstanz enthielt [Endkonzentrationen siehe 2.4.3.]. Diese Gefäße wurden über Nacht bei 25°C liegend für 24 Stunden inkubiert.

2.5.4. Ernte der transformierten Protoplasten

Je Röhrchen wurden 10ml W5 zugegeben und für 10min bei 800rpm zentrifugiert (Laborzentrifuge GS-6KR, Beckmann). Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt bis auf ca. 1ml. Die PP wurden resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluss folgte für zwei Minuten bei 4000rpm eine Zentrifugation (Biofuge Pico, Heraeus). Der Überstand wurde erneut abgesaugt und das verschlossene Eppendorfgefäß samt PP in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die PP wurden bei -70°C gelagert.

2.6. Infiltrationsanalysen

Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden von Fabian Machens im Rahmen seiner Diplomarbeit (Funktionelle Analyse potentiell Pathogen-responsiver *cis*-Elemente aus *Arabidopsis thaliana*) am Institut für Genetik durchgeführt (Fabian Machens, 2008). Zur Analyse der *cis*-Elemente hinsichtlich ihrer Funktionalität wurde die so genannte Agroinfiltration angewandt (Schöb *et al.*, 1997). Dazu wurde eine *Agrobacterium*-Suspension in das Blattgewebe einer Pflanze infiltriert. Dabei wurde eine lokale Infektion der Pflanze hervorgerufen und es kommt zum T-DNA Transfer. Es wurden T-DNA Konstrukte verwendet, bei denen das zu untersuchende *cis*-Element vor ein Reportergen kloniert war. Die Funktionalität des Elementes konnte durch Nachweis von Reportergen-Aktivität nachgewiesen werden (Yang *et al.*, 2000).

Die potentiell Pathogen-responsiven *cis*-Elemente lagen in dem Vektor pBT10-GUS vor (Tabelle 8, Anhang 8.3.). Für die Anwendung im *Agrobacterium*-Infektionssystem wurden die Tetramere aus dem pBT10-Vektor in den T-DNA Vektor pBINGUSintron-sbA-VirG726-pm (8.3.) umklont und in *A. tumefaciens* transformiert. Von diesem Vektor ist in Abbildung 18 ein Ausschnitt gezeigt. Der Vektor trägt ein Reportergen für die β -Glucuronidase (GUS) mit Intron, um eine GUS-Expression in *Agrobacterium* auszuschließen.

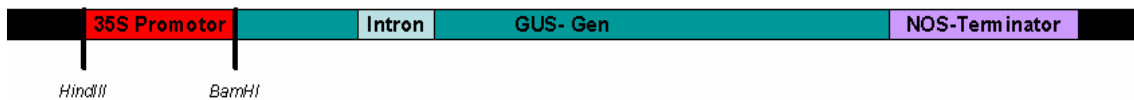


Abbildung 18: Schematischer Ausschnitt aus der T-DNA Region des pBINGUS Vektors. In Rot ist der 35S-Promotor dargestellt. Das GUS-Gen mit Intron (hellblau) und Terminatorregion (violett) ist türkis gekennzeichnet. Der 35S-Promotor liegt zwischen einer *HindIII*- und einer *BamHI*-Schnittstelle.

Durch eine *HindIII*/*BamHI*-Restriktionsspaltung mit dem pBINGUS-Vektor wurde der Promotor entfernt und die entstandenen Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (2.2.3.). Das große Vektorfragment (ca. 15 kb) wurde aus dem Gel aufgereinigt (2.2.4.) und dephosphoryliert (2.2.7.).

Die zu klonierenden Sequenzen wurden mit den Primer MS23_left_*HindIII*_new und MS23_right_*BamHI* aus dem pBT10-GUS Vektor amplifiziert. Die Primer besaßen eine *HindIII*- bzw. *BamHI*-Linkersequenz an ihren Enden. Sie umschließen im pBT10 Vektor die Tetramere sowie die TATA-Box, die als Kernelement des Minimalpromotors dient (Abbildung 19).



Abbildung 19: Schematischer Ausschnitt aus dem pBT10-GUS Vektor. Gezeigt sind das GUS-Gen (türkis), der Minimalpromotor (grau) und das Motiv-Tetramer (blau) sowie die Lage der Klonierungsprimer (rot).

Die PCR-Produkte wurden mit *BamHI* und *HindIII* einer Restriktionsspaltung unterzogen und mittels der so erhaltenen überhängenden Enden mit dem pBINGUSBamHI/*HindIII*-Fragment ligiert (2.2.7.), in *E. coli* transformiert (2.2.6.) und die Plasmide isoliert (2.2.1.). Die erfolgreiche Klonierung und korrekte Orientierung für alle 17 Sequenzen wurden über Sequenzierungen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Über eine PCR mit den Primern pBIN_left und _right wurde eine Multimerisierung der Sequenzen ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Alle Konstrukte wurden in *A. tumefaciens* transformiert und für die Infiltrationsversuche verwendet. Die Infiltrationen wurden an *Nicotiana benthamiana* Pflanzen durchgeführt, da hier eine effektive Infektion durch *A. tumefaciens* erfolgen kann. Die für die Infiltration von *A. tumefaciens*

verwendeten *N. benthamiana* Pflanzen wurden in Erde ausgesät und im Gewächshaus kultiviert. Für die Infiltrationsexperimente wurden ca. 6 Wochen alte Pflanzen verwendet, deren Blätter ausreichend groß für mindestens vier Infiltrationen waren.

Die Herstellung der *Agrobacterium*-Suspensionen erfolgte in modifizierter Form (Wroblewski *et al.*, 2005; siehe Diplomarbeit Fabian Machens, 2008). Die Infiltration erfolgte nach Schöb *et al.* (1997). Es wurde dazu eine 1ml Einmalspritze ohne Nadel (Carl Roth GmbH & Co KG, Kat. # T987.1) mit der Bakteriensuspension gefüllt, an die Blattunterseite angesetzt und die Flüssigkeit mit leichtem Druck in das Gewebe gedrückt, bis eine Fläche von ca. 1 cm Durchmesser infiltriert war. Dabei wurden an einem Blatt immer vier Infiltrationen gleichzeitig durchgeführt. Dies waren die drei Kontrollen (Wasser, TATA-GUS- sowie 35S-GUS-Konstrukt) und das jeweils zu untersuchende Promotor-Reportergen-Konstrukt. Nach der Infiltration wurden die Pflanzen wie zuvor im Gewächshaus weiter kultiviert. Der histochemische Nachweis der GUS-Aktivität erfolgte jeweils nach einem bzw. vier Tagen Inkubation. Alle Infiltrationsexperimente wurden mindestens zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Der histochemische GUS-Nachweis erfolgte nach Jefferson *et al.* (1987). Zur genauen Durchführung siehe Diplomarbeit Fabian Machens (2008).

2.7. β -Glucuronidase-Nachweis

Um potentiell Pathogen-responsive Promotor-Fragmente zu untersuchen wurden Promotor-Reportergen-Konstrukte erstellt (2.3.). In einem Expressionssystem in Protoplasten wurden diese Konstrukte transformiert (2.4.3. bzw. 2.5.3.) und anschließend wird die Expression des Reportergens gemessen. Als Reportergen wird die β -Glucuronidase (*uidA*-Gen) aus *E. coli* verwendet (Jefferson *et al.*, 1987). Für den Nachweis wird in einer Enzymreaktion das Substrat MUG zu 4-MU hydrolysiert, welches durch seine Fluoreszenz nachweisbar ist.

Um die Proteine aus den schockgefrorenen Protoplasten nach der Ernte (2.4.4. bzw. 2.5.4.) zu isolieren, wurden diese zum Auftauen für 5 Minuten mit geöffnetem Deckel in ein Eisbad gestellt. Danach wurden je Eppendorfgefäß unter dem Abzug 150µl GUS-Proteinextraktionspuffer hinzu pipettiert. Nach einem kurzen kräftigen Vortexen wurden die Protoplasten 20min bei 4°C geschüttelt. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation für 10min bei 17.000rpm und 4°C (Biofuge 22R, Heraeus), um die Zelltrümmer zu pelletieren. Die extrahierten Proteine befanden sich danach im Überstand.

Zur Vorbereitung des β -Glucuronidase-Nachweises wurde pro Reaktion ein Eppendorfgefäß mit 450µl GUS-Reaktionspuffer befüllt und im Heizblock auf 37°C erwärmt. Zum Abstoppen einer Reaktion wurden vier Eppendorfgefäße mit 1ml 0,2M Natriumcarbonat-Lösung befüllt.

Der Enzym-kinetische Nachweis lief wie folgt ab: Zum Zeitpunkt 0 wurden 50µl Proteinextrakt zu dem GUS-Reaktionspuffer geben und sofort 50µl der durchmischten Reaktion in die Stopplösung pipettiert. Nach 15min wurden die nächsten 50µl der Reaktion abgestoppt. Ebenfalls wurden nach 30min und nach 45min 50µl der Enzymreaktion in die vorbereitete Natriumcarbonat-Lösung gegeben. Es wurden somit zu vier Zeitpunkten Produkte der Reaktion entnommen, welche im Anschluss fluorimetrisch vermessen wurden. Hierzu wurde das Fluorimeter Perkin Elmer *Luminescence Spectrometer* LS50B im Institut für Mikrobiologie genutzt. Im Messprogramm FL WinLab wurde die Funktion *Scan* ausgewählt. Folgende Parameter wurden eingestellt: Start:455, Stopp:456 und Exication: 365. 600µl einer abgestoppten Reaktion wurden in eine 1ml-Küvette gefüllt und vermessen. Es wurde ein *Scan* durchgeführt und das Ergebnis in Form von Fluoreszenzeinheiten (FU=Fluoreszenzunit) an der y-Achse abgelesen. Diese Werte wurden notiert.

Eine Standardreihe mit verschiedenen 4-MU Konzentrationen wurde erstellt und ebenfalls vermessen. Aus dieser Reihe ergab sich, dass 1FU 0,195 nmol 4-MU/l entspricht. Die aus den Experimenten erhaltenen GUS-Werte wurden in dem Microsoft Anwendungsprogramm Excel nach Berücksichtigung diverser Verdünnungen in pmol 4-MU/(min*mg Protein) umgerechnet (Anhang 8.5.). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden ebenfalls mit Excel bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte wie unter 2.9. beschrieben.

2.8. Luziferase-Nachweis

Luziferasen sind Enzyme, die bei Anwesenheit von Luziferin und Sauerstoff in einer oxidativen Reaktion instabile Produkte (Dioxetane) bilden. Diese zerfallen und eine messbare Biolumineszenz entsteht. Bei einem positiven Signal wurde das Reportergen exprimiert und kann quantifiziert werden.

Um die Proteine aus den schockgefrorenen Protoplasten zu isolieren, wurden diese zum Auftauen für 5 Minuten mit geöffnetem Deckel in ein Eisbad gestellt. Danach wurden je Eppendorfgefäß unterm Abzug 150µl LUC-Proteinextraktionspuffer hinzu pipettiert. Nach einem kurzen kräftigen Vortexen wurden die Protoplasten 20min im 4°C-Raum geschüttelt. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation für 10min bei 17.000rpm und 4°C (Biofuge 22R, Heraeus), um die Zelltrümmer zu pelletieren. Die extrahierten Proteine befanden sich danach im Überstand.

Für die Messung wird das Gerät TriStar® LB 941 der Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad) verwendet. Die dazugehörige Software ist MikroWin 2000 und läuft unter einem Windows-Betriebssystem. In einer 96-Wellplatte wurden je Well 25µl Proteinextrakt pipettiert. Die Platte wurde in das Gerät gestellt und das Programm *Lumi_01s_Kin15.par* wurde durchlaufen. Dabei wurden je Well 175µl LUC-Reaktionspuffer und im Anschluss 50µl Luziferin-Lösung injiziert. Danach wurde sofort eine Kinetik über 15sec Messzeit aufgenommen, bei der die entstehende Biolumineszenz aufgezeichnet wird. Alle 0,1sec wurde ein Messpunkt genommen und ein Integral aus allen Werten gebildet. Als Ergebnis wurde der Mittelwert der Kinetik in RLU (relative Lumineszenz Einheit) über die Messzeit von 15sec angegeben. Die erhaltenen Werte wurden auf die vorhandenen Proteingehalte bezogen (Anhang 8.6.). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit dem Microsoft Anwendungsprogramm Excel bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte wie unter 2.9. beschrieben.

2.9. Proteinbestimmung nach Bradford

10µl Proteinextrakt wurden mit 1ml Bradford-Reagenz (1:5 verdünnt) versetzt (Bradford, 1976). Dieser Ansatz wurde 10min inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen (Ultraspec 2000, Biotech). Als Referenz diente GUS- bzw. LUC-Extraktionspuffers. Zuvor wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden unter Berücksichtigung der Eichgeraden und der Verdünnung in Proteinkonzentrationen (mg/µl) umgerechnet. Die erhaltenen Proteingehalte befinden sich im Anhang 8.5. und 8.6., jeweils bei den entsprechenden GUS- bzw. LUC-Ergebnissen.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung von koregulierten Pathogen-induzierten Genen

Der erste Schritt zur Detektion neuer *cis*-regulatorischer Elemente ist die Identifizierung von koregulierten Pathogen-induzierten Genen. Dazu wurden die prozessierten Daten von Microarrayexperimenten, die *Arabidopsis thaliana* und verschiedene Pathogene, sowie PAMPs und Signalmoleküle betreffen, in die PathoPlant Datenbank importiert (2.1.2.1.). An dieser Datenbank wurden bis zu 6 Stimuli kombiniert abgefragt (2.1.2.2.), um vornehmlich Gene zu identifizieren, die durch Ascomyceten bzw. Oomyceten hochreguliert bzw. induziert wurden. Alle 732 Abfrageergebnisse wurden in Exceltabellen gespeichert und es wurde eine Übersichtstabelle erstellt (Anhang 8.7.). 433 dieser Abfragen lieferten Gengruppen, die für eine Identifizierung gemeinsamer *cis*-regulatorischer Motive mit dem BEST-Softwarepaket geeignet sind. Das heißt, die Anzahl der Gene lag zwischen 2 und 120. Bei 77 Gruppen koregulierter Gene betrug die Anzahl der Gene >120. Nach einem Testlauf zeigte sich, dass diese Anzahl zu analysierender Promotorsequenzen einen großen Zeit- und Rechenaufwand benötigte. In der Studienarbeit von Wiebke Ahrend (2008) wurde durch ein Heraufsetzen des unteren Induktionsfaktors ($>2,0$) die Anzahl der koregulierten Gene in diesen 77 Gruppen auf 120 reduziert, so dass auch diese Promotoren hinsichtlich potentieller *cis*-Elemente analysiert werden konnten. Die Gesamtanzahl von Gengruppen koregulierter Gene (2-120) betrug danach 510 (Anhang 8.7.)

Als Ergebnis der Datenbankabfragen wurde festgestellt, dass bis zu 5 Stimuli kombiniert abgefragt werden konnten, um eine Schnittmenge an koregulierten Genen zu erhalten. Bei sechs verschiedenen Stimuli ergaben sich keine koregulierten Gene. Die höchste Anzahl an hochregulierten Genen bei zwei verschiedenen Stimuli betrug 740 (Abfrage 38H, Anhang 8.7.).

3.2. Identifizierung von 443 konservierten Sequenzmotiven in Pathogen-responsiven Genen

Eine Ursache für die Detektion von koregulierten Gengruppen kann mit dem Vorhandensein von konservierten, regulatorischen Sequenzen in den Promotoren dieser Gengruppen begründet werden. Die Gene werden potentiell gemeinsam durch Transkriptionsfaktoren (TFen) reguliert, welche an konservierte *cis*-Elemente binden und eine koregulierte Genexpression induzieren.

Um solche Sequenzmotive zu detektieren, wurde in den Promotorbereichen der 510 Gengruppen nach konservierten Sequenzmotiven gesucht. Es wurden dafür von den 510 Gengruppen 1000bp lange Promotorsequenzen *upstream* vom Transkriptionsstart (TSS) der koregulierten Gene extrahiert, deren TSS bekannt war (2.1.2.3.). Dabei ergab sich, dass 8 Gengruppen nur ein Gen mit bekannten TSS aufwiesen (Spalte Info =1; Anhang 8.7.) Diese 8 Gengruppen beinhalteten nach der Sequenzextraktion demnach lediglich eine Promotorsequenz, wodurch diese 8 Dateien nicht in die Analyse auf konservierte Sequenzmotive koregulierter Gene einfließen. Mit der Software BEST wurden die 1000bp langen Promotorbereiche der verbleibenden 502 koregulierten Gengruppen nach konservierten Sequenzmotiven untersucht (2.1.2.4.). Es wurden insgesamt 443 Motive in Form von Matrizen detektiert (Anhang Digital A auf CD-ROM).

Die detektierten Motive wurden folgendermaßen bezeichnet:

Vorne steht die Abfragebezeichnung z. B. 3A (Anhang 8.7.). Danach die Nummer des Motivs wie z. B. M1. Bei einem Set von koregulierten Genen können mehrere Motive detektiert werden. Das erste identifizierte Motiv erhielt die Bezeichnung M1. Die folgenden Motive entsprechend der Reihenfolge ihrer Detektion demnach M2, M3, usw. Bei einigen Sets von koregulierten Genen konnten bis zu vier Motive (_M1; _M2; _M3; _M4) identifiziert werden (Abfrage 3M, 12HH, 21S; Anhang Digital A auf CD-ROM). Wurde eine Einzelsequenz ausgewählt, um experimentell überprüft zu werden (3.8.), so erhält sie einen Zusatz zur Motivbezeichnung. Die erste ausgewählte Sequenz erhält die Bezeichnung S1. Demnach kann eine Einzelsequenz die Bezeichnung 3A_M1_S1 erhalten und eindeutig zugeordnet werden.

3.3. Identifizierung von identischen Motiven

Es kam vor, dass sich bei unterschiedlichen Stimuli die gleichen koregulierten Gene ergaben. Somit können identische Motive als Ergebnis erhalten werden. Diese wurden mithilfe des Webservers STAMP (<http://www.benoslab.pitt.edu/stamp/>; Mahony und Benos, 2007) detektiert (2.1.2.5.). Die identischen Motive redundanter Gengruppen (GG) wurden zu neuen Motiven zusammengefasst (Tabelle 9), damit bei der vergleichenden, systematisierenden Analyse aller Motive untereinander nur einzigartige Motive verglichen wurden. Dabei wurde die Anzahl der 443 identifizierten Motive auf 407 reduziert (Anhang Digital B auf CD-ROM).

Tabelle 9: Übersicht der 16 neu gebildeten Gengruppen, da einige Abfragen aufgrund identischer koregulierter Gene identische Motiv-Ergebnisse lieferten. Bei den gebildeten Gengruppen GG3, GG4, GG5, GG7, GG13, GG14 und GG15 gab es zwei Motive (_M1, _M2), bei den übrigen Gengruppen lag ein Motiv vor (_M1).

Gengruppe	identische Motive	neue Motivbezeichnung
GG1	9D_M1; 9Q_M1; 15J_M1; 15JJ_M1; 15JJJ_M1; 20E_M1; 22JJJ_M1; 22JJJJ_M1; 26EEE_M1	GG1_M1
GG2	12D_M1; 15HH_M1	GG2_M1
GG3	12E_M1; 12EE_M1; 15KK_M1; 15KKK_M1; 22KKK_M1 12E_M2; 12EE_M2; 15KK_M2; 15KKK_M2; 22KKK_M2	GG3_M1 GG3_M2
GG4	12KK_M1; 14L_M1 12KK_M2; 14L_M2	GG4_M1 GG4_M2
GG5	14K_M1; 15V_M1 14K_M2; 15V_M2	GG5_M1 GG5_M2
GG6	15A_M1; 15AAA_M1	GG6_M1
GG7	15B_M1; 15BBB_M1 15B_M2; 15BBB_M2	GG7_M1 GG7_M2
GG8	15C_M1; 15CCC_M1	GG8_M1
GG9	15D_M1; 15DDD_M1	GG9_M1
GG10	21L-2_M1; 22V_M1	GG10_M1
GG11	22A_M1; 22AA_M1	GG11_M1
GG12	22J_M1; 22JJ_M1	GG12_M1
GG13	27D-9_M1; 27D-10_M1 27D-9_M2; 27D-10_M2	GG13_M1 GG13_M2

Gengruppe	identische Motive	neue Motivbezeichnung
GG14	27G-12_M1; 27H-12_M1 27G-12_M2; 27H-12_M2	GG14_M1 GG14_M2
GG15	28C-7_M1; 28C-8_M1 28C-7_M2; 28C-8_M2	GG15_M1 GG15_M2
GG16	30B-7_M1; 30B-8_M1	GG16_M1

Es gab auch einige wenige Fälle, bei denen ein Set an koregulierten Genen ein Subset an Genen enthielt, die bereits von einer anderen Abfrage identifiziert wurden. In diesen Fällen kam es vor, dass erneut gleiche Ergebnisse (identische Motive) detektiert wurden. Diese Fälle wurden aber nicht in neue Motive zusammengefasst, da der Ursprungsinformationsgehalt (unterschiedliche Anzahl koregulierte Gene im Ausgangsdatensatz) mit einer gleichen Motivbezeichnung verloren gegangen wäre. Diese Fälle (Bezeichnung *subsets*) sind in Folge aufgelistet:

- 18B_M1 & 19M_M2
- 31C_M1 & 31D_M1
- 12u_M1 & 21S_M1
- 12GG_M1 & 14E_M1
- 27D-2_M1 & 27D-4_M1
- 27A-2_M1 & 27G-4_M1
- GG_12_M1 & 22KK_M1
- 12I_M1 & 14S_M1
- GG5_M1 & 14W_M1

Es wurden nur die neun aufgeführten Fälle von *subsets* innerhalb der 407 Motive identifiziert.

3.4. Klassifizierung der identifizierten Motive

Die 407 Motive beinhalten zum einen sehr unterschiedliche Sequenzmotive, zum anderen aber auch ähnliche Motive. Es ist notwendig die große Anzahl an Motiven aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu systematisieren. Mit Hilfe des Webservers STAMP (Mahony und Benos, 2007) konnte unter Berücksichtigung der gebildeten Gengruppen eine Klassifizierung aller 407 Motive erstellt werden. STAMP stellt Verwandtschaftsgrade der Motive aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten in einem Baumdiagramm dar.

Nach der voreingestellten agglomerativen Methode (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*; UPGMA) wurden Cluster gebildet, die zunächst genau ein Objekt (ein Motiv) enthielten. Jedes Objekt war seinem eigenem Cluster zugeordnet. Anschließend wurden die Cluster solange zusammen geführt (progressiv aufgebaut), bis ein bestimmtes Abbruchkriterium erreicht war. Das Kriterium war eine mindere Sequenzähnlichkeit der Motive. Es fand eine Baumbildung mit fortschreitender Vereinigung der ähnlichsten Motive zu einem Knotenpunkt statt. Das passierte solange, bis nur noch ein Ursprungsknotenpunkt (*root-node*) übrig blieb. Dieses „ClustalW“-ähnliche multiple Alignment illustriert Ähnlichkeiten und Redundanzen innerhalb einer Sammlung von Sequenzmotiven in einer Baumstruktur. Letztendlich verzweigt sich der Baum so weit, bis an jedem Astende ein Motiv steht. Die Länge eines Astes charakterisiert den Verwandtschaftsgrad (Ähnlichkeitsgrad).

Die Feinverästelung wurde nachträglich reduziert auf einen Bereich, wo kein folgender Ast länger als der vorangegangene Ast ist. Der *cut-off* wurde so gewählt, dass durch die Darstellung kein Verlust an Verwandtschaftsgraden vorliegt. Das Ergebnis wurde mit dem Programm MEGA (Tamura *et al.*, 2007) in Form eines Stammbaumes visualisiert, in PowerPoint (Microsoft) bearbeitet und vereinfacht dargestellt (Abbildung 20). Es ergaben sich 37 Gruppen von Motiven mit verschiedenen vielen Mitgliedern. Die Anzahl der Mitglieder einer Gruppe reichte von 2 Mitgliedern (z. B. Gruppe 2), bis hin zu 76 Gruppenmitgliedern (Gruppe 1).

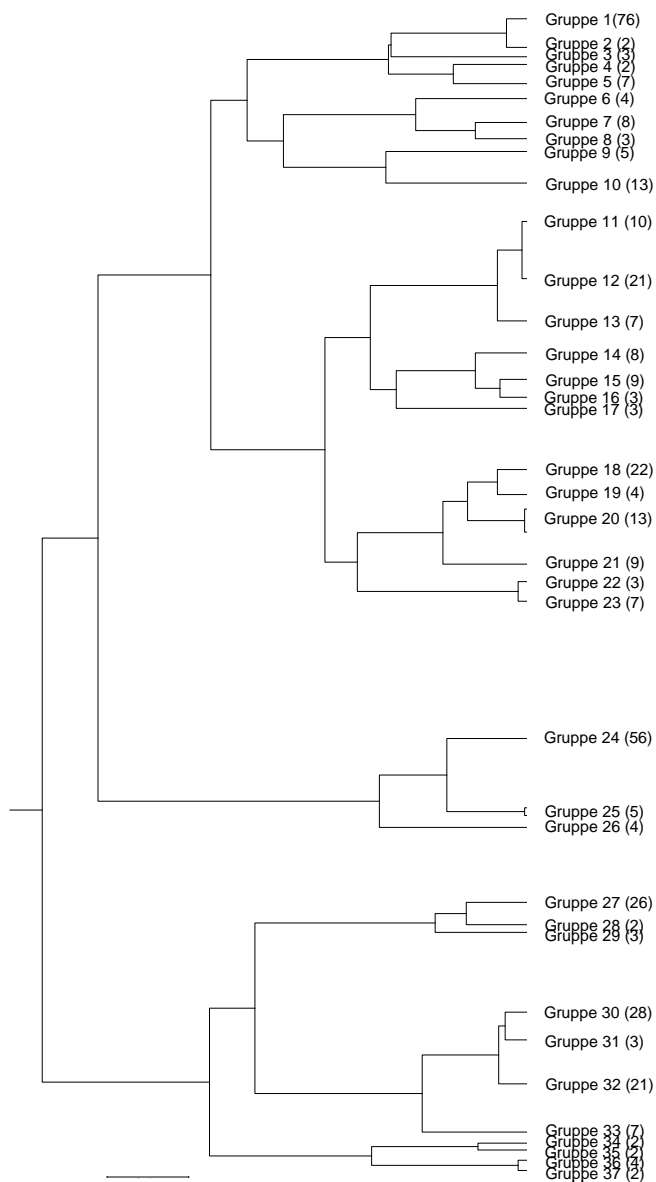


Abbildung 20: Ergebnis der Klassifizierung der identifizierten 407 Motive mit dem Webserver STAMP. Darstellung der aufgrund von Sequenzähnlichkeiten gebildeten 37 Motivgruppen mit dem Programm MEGA nach nachträglicher Reduktion der Baumstruktur durch einen *cut-off*.

Die Zuordnung aller identifizierten Motive in die klassifizierten Gruppen ist in Tabelle 10 dargelegt. Durch diese Gruppenbildung wurden die 407 Motive systematisiert und eine übersichtliche Einteilung erhalten.

Tabelle 10: Die Tabelle beinhaltet alle identifizierten Motive und deren Bezeichnung. Die Gruppeneinteilung wurde durch nachträgliche Zusammenführung der ähnlichen Motive erhalten. Insgesamt wurden 37 Motivgruppen erstellt.

Gruppe	Motivbezeichnung
Gruppe 1	3B_M1; 38H_M1; 26TTT_M1; 24d_M1; 38HH_M1; 15M_M1; 21B_M1; 32H-1_M1; 12FF_M1; 14D_M1; 15N_M1; 14C_M1; 14B_M1; 34G-1_M1; 25M_M1; 21M_M1; 22M_M1; 3M_M1; 14H_M1; 18N_M1; 19M_M1; 14F_M1; 24a_M1; 24b_M1; 25L_M2; 14A_M1; 15L_M1; 38P_M1; 38NN_M1; 12F_M1; 14N_M1; 14P_M1; 20II_M1; 21G_M1; 20NNN_M1; 21I_M1; 32D_M1; 21H-2_M1; 27I-7_M1; 26JJJ_M1; 27H-7_M1; 12MMM_M1; 14M_M1; 19O_M1; 21A-2_M1; 21B-2_M1; 22L_M1; 34G-2_M1; 34G-3_M1; 12HH_M1; 20A_M1; 38KK_M1; 12s_M1; 20J_M1; 29OO_M2; 14O_M1; 21P_M1; 20FF_M1; 21D_M2; 21D-2_M1; 21N_M1; 21C-2_M1; 22N_M1; 20F_M1; 21O_M1; 19N_M1; 15N_M2; 29PP_M2; 18F_M1; 24R_M1; 24R_M2; 12i_M1; 20G_M1; 20DD_M1; 22HH_M1; 38V_M1
Gruppe 2	18B_M1; 38E_M1
Gruppe 3	20a_M3; 21X_M2; 21A_M1
Gruppe 4	12c_M1; 20c_M3
Gruppe 5	20p_M1; 26p_M1; 27G-5_M1; 27H-5_M1; 20u_M1; 27C-4_M1; 28M-1_M1
Gruppe 6	9P_M1; 18U_M1; 28M-8_M1; 40A_M1
Gruppe 7	12H_M3; 12HH_M4; 14F_M3; 20s_M1; 24F_M1; 31E_M1; 38B-2_M1; 38D-2_M1
Gruppe 8	38F_M1; 38F_M2; 38O_M1
Gruppe 9	GG5_M2; 27I-11_M1; 14W_M1; 26f_M1; 26g_M1
Gruppe 10	18B_M2; 18N_M2; 19M_M2; 19O_M2; 24B_M1; 31C_M1; 31D_M1; 18C_M2; 18D_M2; 19N_M2; 34G-1_M2; 34G-4_M2; 18D_M1
Gruppe 11	3C_M1; 12H_M2; 12HH_M3; 14F_M2; 38K-2_M1; GG6_M1; GG11_M1; 20a_M2; 22DDD_M1; 21G-2_M1
Gruppe 12	3I_M3; 18H_M2; 16MM_M1; 37D_M1; 38M_M1; 38N_M1; 26QQQ_M1; 38J-3_M1; 26UUU_M2; 23LLL_M1; 34G-4_M1; 26LLL_M1; 38C-2_M1; 27F-6_M1; 27H-8_M1; GG9_M1; 15DD_M1; 26KKK_M1; 37E_M1; 24I_M2; 32O_M1
Gruppe 13	19Q_M1; 21L_M1; 22DDDD_M1; 38L_M2; 38O_M2; 38Y_M1; 38O_M3

Gruppe 14	3N_M1; 12u_M1; 20I_M1; 21S_M2; 26u_M1; 14G_M1; 21S_M1; 28H-9_M1
Gruppe 15	12a_M1; 20a_M1; 12c_M2; 12f_M1; GG7_M1; 20D_M1; 12f_M2; 20D_M2; 20D_M3
Gruppe 16	24O_M1; 24P_M2; 30H-6_M1
Gruppe 17	12q_M2; 20q_M1; 24H_M1
Gruppe 18	3D_M1; 28M-3_M1; 12G_M2; 27I-3_M1; 14O_M2; 21O_M3; 21C_M1; 21C-2_M2; 20OOO_M1; 20c_M2; 30I-6_M1; 26CCC_M2; 28B-1_M1; 30G-6_M1; 24U_M2; 34H-3_M1; 24V_M2; 41G_M1; 26RRR_M1; 20JJJ_M1; 27G-3_M1; 28M-3_M2
Gruppe 19	30I-6_M2; 41J_M1; 38L_M3; 38Y_M2
Gruppe 20	3M_M3; 27A-4_M1; 9I_M1; 12DD_M1; 24f_M1; 12HH_M2; 38J_M1; 21F_M2; 20H_M1; 26TTT_M2; 26UUU_M1; 37C_M1; GG15_M1
Gruppe 21	GG8_M1; 27G-8_M1; GG10_M1; 27B-9_M1; GG14_M1; 27B-4_M1; 27B-10_M1; 26WW_M2; GG15_M2
Gruppe 22	GG4_M2; 12N_M1; 38H-2_M1
Gruppe 23	12t_M1; 26s_M1; 27G-4_M1; 27H-4_M1; 27H-2_M1; 27D-4_M3; 27G-2_M2
Gruppe 24	3B_M2; 9K_M1; 12G_M1; 20GG_M1; 21F-2_M1; 21Q_M1; 12GG_M1; 14E_M1; 14J_M1; 12JJJ_M1; 14T_M1; 21I_M2; 15M_M2; 21H_M1; 20r_M1; 24M_M1; 24a_M2; 25L_M1; 12LLL_M1; 30H-7_M1; 30H-8_M2; 21B_M2; 21D_M1; 24g_M1; 29LL_M2; 24h_M1; GG4_M1; 20F_M2; 21O_M2; 20KK_M1; 21X_M1; 21M-2_M1; 28M-12_M1; 26s_M2; 27G-2_M1; 27D-2_M1; 27D-4_M2; 27D-4_M1; 27D-6_M1; 21C-2_M3; 29LL_M1; 24I_M1; 29OO_M1; 30A-7_M1; 30G-7_M1; 30G-8_M1; 29MM_M1; 30A-8_M1; GG16_M1; 24J_M1; 34H-1_M1; 24V_M1; 25U_M1; 27A-2_M1; 27G-4_M2; 27H-2_M2
Gruppe 25	9J_M1; 24U_M1; 30A-6_M1; 9K_M2; 15BB_M1
Gruppe 26	GG1_M1; GG12_M1; 22KK_M1; 18C_M1
Gruppe 27	3I_M1; 3J_M1; 40B_M1; 12JJJJ_M1; 22S_M1; 38I_M1; 38L_M1; 25U_M2; 38T_M1; 32I-1_M1; 38W_M1; 38R_M1; 38K-2_M2; 26u_M2; 12I_M1; 14S_M1; 21S_M3; 20JJ_M1; 30I-8_M1; 3I_M2; 30I-7_M1; 30H-8_M1; 31G_M1; GG13_M1; 30H-6_M2; GG13_M2
Gruppe 28	30I-5_M1; 31E_M2
Gruppe 29	27G-7_M1; 28D-1_M1; 30I-7_M2
Gruppe 30	3M_M2; 3M_M4; 9B_M1; 3N_M2; 12CC_M1; 21N_M2; 14T_M2; 21T_M1; 15S_M1; 20HH_M1; 38X_M1; 20NNN_M2; 21F_M1; 25Q_M1; 32M-1_M1; 20i_M1; 22CCCC_M1; GG2_M1; 20KK_M2; 20OO_M2; 20c_M1; 21M-2_M2; 22B_M1; 22BB_M1; 22BBB_M1;

	GG7_M2; 12II_M1; 24T_M1
Gruppe 31	12i_M2; 29OO_M3; 22AAA_M1
Gruppe 32	GG3_M1; 20EE_M2; GG3_M2; 12q_M1; 21S_M4; 18O_M1; 24P_M1; 20EE_M1; 18P_M1; 29PP_M1; 24D_M1; 25L_M3; 12r_M1; 20OO_M1; 22CC_M1; 22C_M1; 22CCC_M1; 37P-2_M1; 26CCC_M1; 26WW_M1; GG14_M2
Gruppe 33	12H_M1; 12s_M2; 14R_M1; 20s_M2; 18H_M1; 24f_M2; 22KK_M2
Gruppe 34	12g_M1; 16LL_M1
Gruppe 35	27A-6_M1; 27F-2_M1
Gruppe 36	GG5_M1; 14W_M2; 27I-11_M2; 28B-1_M2
Gruppe 37	24a_M3; 38V_M2

3.5. Datenbankabgleich der Motivgruppen

Ziel war es unbekannte, Pathogen-responsive *cis*-Elemente zu identifizieren. Die aus den 407 Motiven gebildeten 37 Motivgruppen sollten über einen Homologieabgleich mit bekannten *cis*-regulatorischen Sequenzen abgeglichen werden.

Zu allen 37 gebildeten Motivgruppen wurden mittels STAMP (Mahony und Benos, 2007) so genannte Familienprofile (FBP = *family binding profil*) erstellt. Dabei wurden die Matrizen aller Motive einer Gruppe in einer gewichteten Matrize (PSSM = *position-specific scoring matrize*) zusammengefasst (z. B. FBP_Gruppe1, Anhang Digital C auf CD-ROM). Diese Matrize kann zum einen als Sequenzlogo und somit als Familienprofil visualisiert werden. Zum anderen konnte über eine BLAST-ähnliche Datenbankabfrage mit den gewichteten Matrizen ein Abgleich mit den Datenbanken PLACE, AGRIS, und AthaMap durchgeführt werden (2.1.2.5.).

AGRIS (*Arabidopsis Gene Regulatory Information Server*; Davuluri *et al.*, 2003; Palaniswamy *et al.*, 2006) vereint zwei Datenbanken. Es beinhaltet die AtcisDB (*Arabidopsis thaliana cis-regulatory database*) und die AtTFDB (*Arabidopsis thaliana transcription factor database*). AtcisDB besitzt 25.806 Promotorsequenzen von annotierten *Arabidopsis thaliana* Genen mit einer Beschreibung von putativen *cis*-regulatorischen Elementen. AtTFDB enthält

Informationen von 1.690 Transkriptionsfaktoren, welche aufgrund ihrer vorhandenen konservierten DNA-Bindungsdomäne in 50 Transkriptionsfaktorfamilien eingeteilt sind. Bei der Datenbank PLACE (*Plant cis-acting regulatory DNA elements*) handelt es sich um eine Sammlung von Sequenzmotiven, die in *cis*-agierenden regulatorischen DNA-Elementen von Pflanzen identifiziert wurden (Higo *et al.*, 1998). AthaMap stellt eine genomweite Karte mit Transkriptionsfaktorbindungsstellen dar, welche aus der Literatur Matrizen-basiert oder Einzelsequenzen-basiert annotiert wurden (Steffens *et al.*, 2004; Bülow *et al.*, 2006).

Der Abgleich der Matrizen mit den Datenbankinhalten diente dazu, Homologien zu *cis*-Elementen bzw. Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen (TF-BS) zu detektieren und potentielle TF-Familien für die Motivgruppen vorherzusagen. Der Webserver STAMP ermöglicht das Trimmen der zu analysierenden Motive. Der voreingestellte Schwellenwert von 0,4 wurde beibehalten. Es wurde angegeben, dass die höchste Übereinstimmung eines jeden Motivs ausgegeben werden sollte. Die Auswahl des *Pearson Correlation Coefficient* liefert laut Mahony und Benos (2007) das beste Ergebnis für den Vergleich von vollständigen Motiven. Bei der Alignment-Methode wurde ein lokales Alignment gewählt (Smith-Waterman-Methode), welche ohne Zulassung von Lücken angewählt wurde. Diese Methode eignet sich nach Mahony und Benos (2007) vor allem für den Abgleich von kurzen Motiven, wie sie der Großteil der identifizierten Motive darstellt. Bei STAMP werden ein E-value und ein Sequenzalignment ausgegeben. Ein E-value (Sandelin und Wassermann, 2004) stellt ein Maß für die Wahrscheinlichkeit dar, dass die Ähnlichkeit zwischen zwei Motiven zufällig ist. Je kleiner der E-value, desto niedriger die Wahrscheinlichkeit, dass das Ereignis (die Ähnlichkeit) zufällig ist. Es ist möglich einen niedrigen E-value zu erhalten, obwohl das Motiv nicht sehr ähnlich ist. Das ist häufig bei langen Motiven der Fall, wenn nur einige wenige Nukleotide übereinstimmen, der Rest der Sequenz jedoch keine große Ähnlichkeit aufweist. Der E-value dient daher laut Autoren eher als relatives Maß einer vorhandenen Ähnlichkeit.

Die Ergebnisse, die mit den Familienprofilen erhalten wurden, werden im folgenden erläutert. Dabei sind neben den Sequenzlogos der Familienprofile in den Abbildungen der Motivgruppen jeweils ein oder mehrere Übereinstimmungen mit bekannten *cis*-Elementen aus den erwähnten DB in Form eines Sequenzlogos dargestellt. Die beste Übereinstimmung wird dargestellt und ist durch den niedrigsten E-value im Vergleich aller DB-Ergebnisse charakterisiert. Alle weiteren Ergebnisse befinden sich im Anhang Digital C auf CD-ROM. Ebenfalls wird ein Alignment der Consensussequenz des Familienprofils mit dem besten Treffer (ähnlichstes *cis*-Element) aufgeführt. Der Informationsgehalt dieser Ergebnisse ist bei sehr heterogenen Motiven einer Gruppe oder Motiven mit einem geringen Konservierungsgrad nicht sehr hoch. Es wird darauf verwiesen, dass alle 407 Einzelmotive ebenfalls mittels STAMP auf Homologien mit *cis*-Elementen bzw. TF-BS der Datenbankinhalte von PLACE, AGRIS und AthaMap verglichen wurden. Die Ergebnisse befinden sich im Anhang Digital D auf CD-ROM.

Gruppe 1 besteht aus 76 Mitgliedern. Das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 1 in Abbildung 21 zeigt mit hoher Ähnlichkeit die klassische G-Box (Williams *et al.*, 1992). Dieses *cis*-Element wird von bZIP TFen erkannt (Foster *et al.*, 1994). Diese Faktoren werden als *G-box binding factors* (GBFs) bezeichnet (Siberil *et al.*, 2001).



Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 1	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	GBOXLERBCS (8.7610e-11)	--CACGTGK GCCACGTGK	 (PLACE)

Abbildung 21: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 1 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt.

Die Motivgruppe 2 beinhaltet lediglich zwei Motive (18B_M1 und 38E_M1). Die größte Ähnlichkeit wurde zu einem ABRE-(ABA *response*) ähnlichen Element aus *Brassicaceen* (Ezcurra *et al.*, 2000) in der DB PLACE detektiert (Abbildung 22). ABFs (ABRE *binding factors*) gehören ebenfalls zur bZIP TF-Familie (Finkelstein *et al.*, 2005). Allerdings ist die Übereinstimmung aufgrund des ermittelten E-values sehr gering.



Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 2	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	ABREDISTBNNAPA {8.4430e-05}	GMNGGACRAGTGTGRAC ----GACAAGTGGC---	

Abbildung 22: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 2 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Gruppe 3 besteht aus 3 Mitgliedern (20a_M3, 21X_M2, 21A_M1), welche geringe Übereinstimmungen (Abbildung 23) zu einem ABF(ABRE *binding factor*) 1- Element aus *Arabidopsis thaliana* zeigen (Choi *et al.*, 2000). Wie unter Motivgruppe 2 schon erwähnt gehören die ABFs zur bZIP TF-Familie (Rock, 2000).



Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 3	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	ABREATCONSENSUS {1.8802e-06}	GCWTTMGCCAYGYNY -----GCCACGTR-	

Abbildung 23: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 3 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Die Motivgruppe 4 besteht aus den zwei Mitgliedern 12c_M1 und 20c_M3. In Abbildung 24 weist das Sequenzlogo des Familienprofils eine Homologie zu einer Bindungsstelle von pflanzlichen MYB TFen auf (Chen *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2009). Die Bindungsstelle zeigt allerdings nur geringe Übereinstimmungen zu einem kleinen Teilbereich mit der zu vergleichenden Consensussequenz des Familienprofils (Abbildung 24). Dieses Resultat spiegelt sich auch im Wert des E-values wieder.

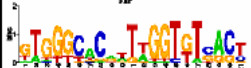

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 4	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	MYBPLANT (4.1964e-06)	GTGGGCACNWTWGGTGSACT -----GKTWGGTK-----	 (PLACE)

Abbildung 24: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 4 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Gruppe 5 besteht aus 7 Motivmitgliedern. Der DB-Abgleich in Abbildung 25 zeigte eine Übereinstimmung zu einer Bindestelle von TGA1 aus Tabak (*Nicotiana tabacum*) (Strompen *et al.*, 1998). Das *cis*-Element wurde im PR1a-Genpromotor detektiert. TGA TFen gehören erneut zur bZIP-Familie von TFen (Kim und Delaney, 2002). Außerdem ist bekannt, dass diese TFen die PR-Genexpression regulieren und somit den Pflanzen eine Resistenz vermitteln können (Kesarwani *et al.*, 2007).



Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 5	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	TGA1ANTPR1A (9.2457e-09)	CGTCACWKCTGTGACG CGTCATCTCGATGACG	 (PLACE)

Abbildung 25: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 5 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt.

Das Familienprofil der Gruppe 6 (4 Mitglieder) in Abbildung 26 zeigt ein sehr schwach konserviertes, langes Sequenzlogo. Eine geringe Übereinstimmung wurde zu einer Bindestelle des bZIP-Faktors 911_1 aus *Antirrhinum majus* Blüten detektiert (Martínez-García *et al.*, 1998).

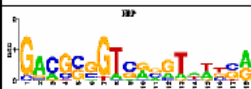
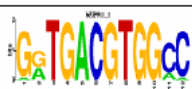
Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 6	Bezeichnung des ähnlichen cis-Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: cis-Element	Sequenzlogo des ähnlichen cis-Elementes (DB)
	bZIP911_1 (6.2633e-03)	YSNWNACNYSACCSCGTC -GRTGACGTGGCC-----	 (AthaMap)

Abbildung 26: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 6 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen cis-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das cis-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des cis-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen cis-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt.

Motivgruppe 7 besteht aus 8 Motiven. Das Sequenzlogo des Familienprofils (Abbildung 27) besitzt eine sehr hohe Übereinstimmung zur palindromischen Box-C aus der Sojabohne (*Glycine max*), an welche bZIP Faktoren binden (Cheong *et al.*, 1998).



Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 7	Bezeichnung des ähnlichen cis-Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: cis-Element	Sequenzlogo des ähnlichen cis-Elementes (DB)
	PALINDROMICBOXGM (6.3524e-12)	TNACGTCANC TGACGTCA--	 (PLACE)

Abbildung 27: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 7 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen cis-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das cis-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des cis-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen cis-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt.

Die Motivgruppe 8 besteht aus den drei Motiven 38F_M1, 38F_M2 und 38O_M1. Das Sequenzlogo des Familienprofils (Abbildung 28) zeigte eine Homologie zum PI-Element aus *Arabidopsis*. Das *cis*-Element stammt aus dem Promotor der Glycerin-Aldehyd-Dehydrogenase Gens (Chan *et al.*, 2001).

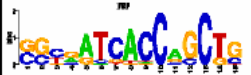

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 8	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	PIATGAPB (1.3566e-06)	SGYRATCACCRCGTG -GTGATCAC-----	 (PLACE)

Abbildung 28: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 8 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt.

Motivgruppe 9 besteht aus 5 Mitgliedern: GG5_M2, 27I-11_M1, 14W_M1, 26f_M1 und 26g_M1. Eine geringe Ähnlichkeit des Familienprofils zeigt sich in Abbildung 29 im Sequenzlogo zu der bZip-BS 910_2 aus *Antirrhinum majus* Blüten (Martínez-García *et al.*, 1998).

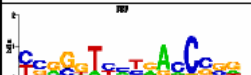

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 9	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	bZIP910_2 (5.4670e-05)	NSSGGTYRNRACCYSR --ACGTCAGCAYSC--	 (AthaMap)

Abbildung 29: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 9 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 10 besteht aus 13 Mitgliedern. Das Sequenzlogo des Familienprofils (Abbildung 30) zeigte eine geringe Homologie zu WAR (*wounding activating region*), welche im Promotor des Extensin Gens in Raps (*Brassica napus*) vorkommt (Elliott und Shirsat, 1998).

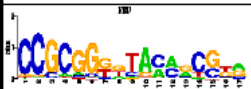
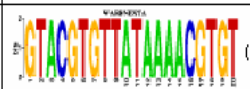
Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 10	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	WARBEXTA (2.3611e-04)	-YMCGYKKTANMCCGCGG-- ACACGCTTTATAACACGTAC	

Abbildung 30: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 10 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Die Motivgruppe 11 besteht aus 10 Motivmitgliedern. Eine Ähnlichkeit des Familienprofils (Abbildung 31) zeigte das Alignment der Consensussequenz zur Box B aus der Gartenbohne (*Pisum sativum*), welche im Promotor des Asparagin-Synthase 1 Gens (AS1) vorkommt (Ngai *et al.*, 1997). An die Box B binden TFen unbekannter Art. Die AS1 wird durch Licht negativ reguliert (Ngai *et al.*, 1997).

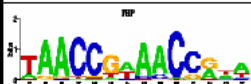

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 11	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	BOXBPSAS1 (2.0501e-06)	TAACCGAACCRW-- -AAACGACACCGTTT	

Abbildung 31: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 11 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt.

Die Motivgruppe 12 besteht aus 21 Gruppenmitgliedern. Die höchste Homologie (Abbildung 32) zeigte das Sequenzlogo zu einem Elicitor responsiven Element aus der Petersilie (*Petroselinum crispum*), welches im PAL(Phenyl-Alanin-Ammoniumlyase)-1-Promotor vorkommt (Lois *et al.*, 1989). Allerdings weist der E-value auf eine geringe Ähnlichkeit hin.

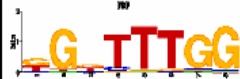

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 12	Bezeichnung des ähnlichen cis-Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: cis-Element	Sequenzlogo des ähnlichen cis-Elementes (DB)
	ELRE1PCPAL1 (1.8295e-05)	----KGKTTTGG----- GAAGGGGTTTGGTTGGAG	 (PLACE)

Abbildung 32: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 12 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen cis-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das cis-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des cis-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen cis-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen cis-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 13 besteht aus 7 Mitgliedern. Nach dem Datenbankabgleich wurde eine Ähnlichkeit des Sequenzlogos des Familienprofils (Abbildung 33) zu dem Licht-responsiven Element (LRE) aus Petersilie (*Petroselinum crispum*) im Promotor der Chalcon-Synthase detektiert. Dieses cis-Element ist für Licht-abhängige Genexpression notwendig (Schulze-Lefert *et al.*, 1989). An diese Sequenz bindet vermutlich ein MYB-Faktor, PcMYB1. Dieser TF besitzt lediglich eine MYB-Wiederholung in der AS-Sequenz (Feldbrügge *et al.*, 1997).

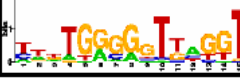

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 13	Bezeichnung des ähnlichen cis-Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: cis-Element	Sequenzlogo des ähnlichen cis-Elementes (DB)
	LREBOXIPCCHS1 (7.2187e-07)	YWNTGGGGGTTKNGT- -----AGGTTAGGTT	 (PLACE)

Abbildung 33: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 13 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen cis-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das cis-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des cis-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen cis-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen cis-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 14 besteht aus 8 Motiven. Das Sequenzlogo des Familienprofils (Abbildung 34) zeigte, bis auf ein Nukleotid, eine 100%ige Homologie zum ACGT-Motiv aus dem Glu(Glutelin)B-1 Gen aus Reis (*Oryza sativa*) (Washida *et al.*, 1999). Dieses *cis*-Element vermittelt eine Endosperm-spezifische Genexpression (Wu *et al.*, 2000).

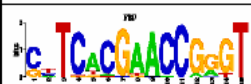

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 14	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	ACGTOSGLUB1 {9.1582e-05}	CNTCACGAACCGGT ---CACGTAC----	 (PLACE)

Abbildung 34: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 14 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Konsensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Gruppe 15 besteht aus 9 Motiven. Abbildung 35 zeigt, dass über die Matrize des Familienprofils eine schwache Homologie zum SORLIP(*sequences over-represented in light induced promoters*)3-Element aus *Arabidopsis* festgestellt werden konnte. Es handelt sich hierbei um Sequenzen, welche überrepräsentiert in Promotoren von Licht-induzierten Genen vorkommen (Hudson und Quail, 2003).

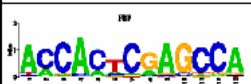

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 15	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	SORLIP3 {2.7485e-05}	TGGCTCGAGTGGT ---CTCAAGTGA-	 (AGRIS)

Abbildung 35: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 15 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Konsensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt.

Gruppe 16 beinhaltet die drei Motive 24O_M1, 24P_M2 und 30H-6_M1. Eine Homologie des gering konservierten Sequenzlogos des Familienprofils (Abbildung 36) wurde zur BS1(*binding site 1*) im Promotor der Cinnamoyl-CoA Reduktase (CCR) in Eucalyptuspflanzen (*E. gunnii*) detektiert. Es ist eine Bindungsstelle von TFen, welche vaskuläre Genexpression kontrollieren (Lacombe *et al.*, 2000).

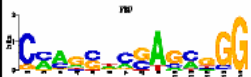

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 16	Bezeichnung des ähnlichen cis-Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: cis-Element	Sequenzlogo des ähnlichen cis-Elementes (DB)
	BS1EGCCR {1.6230e-06}	CCCKCTSGNSCTKG CCCGCT-----	

Abbildung 36: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 16 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Die Motivgruppe 17 besteht aus den drei Motiven 12q_M2, 20q_M1 und 24H_M1. Das Sequenzlogo des Familienprofils (Abbildung 37) ist 16nt lang und zeigte eine sehr geringe Ähnlichkeit zur Bindungssequenz des bZIP TFs 911_1 (siehe Motivgruppe 6).

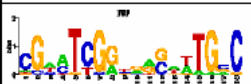

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 17	Bezeichnung des ähnlichen cis-Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: cis-Element	Sequenzlogo des ähnlichen cis-Elementes (DB)
	bZIP911_1 {6.9144e-04}	GNCAWWSYYNCCGAKNCG GGCCACGTCAVC-----	

Abbildung 37: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 17 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 18 besteht aus 22 Mitgliedern. Eine Homologie des Familienprofils (Abbildung 38) zeigte sich zum ACII-Element, welches im Promotor des PAL2-Gens der Bohne (*Phaseolus vulgaris*) vorkommt. Das *cis*-Element vermittelt eine vaskuläre Genexpression. Insgesamt sind drei AC-Elemente bekannt (Hatton *et al.*, 1995). Eine potentielle TF-Familie stellen die MYB-Faktoren dar.

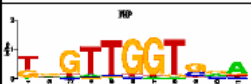

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 18	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	ACIIPVPAL2 {2.3434e-09}	--TNGTTGGTSNA GGGGGTTGGTGG--	 (PLACE)

Abbildung 38: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 18 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Konsensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 19 besteht aus den 4 Motiven 30I-6_M2, 41J_M1, 38L_M3 und 38Y_M2. Das Sequenzlogo des Familienprofils zeigt in Abbildung 39 eine geringe Ähnlichkeit zu einem 10bp-Motiv innerhalb der B-Box im Promotor des Patatin-Gens in der Kartoffel (*Solanum tuberosum*). Das Element ist Knollenspezifisch und durch Sucrose induzierbar. An diese B-Box bindet *Storekeeper* (STK) und reguliert die Patatin-Expression (Zourelidou *et al.*, 2002).

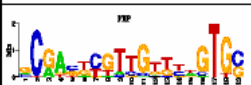

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 19	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	BBOXSITE1STPAT {9.8626e-05}	NCGASKCGTTGTTTNGTGS -----ATTGTTTAGC--	 (PLACE)

Abbildung 39: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 19 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Konsensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Die Motivgruppe 20 umfasst 13 Motive. Eine Homologie dieser Motivgruppe zeigte sich zum *siteII*-Element aus Promotorregionen von Cytochromgenen (Cyt-1, Cyt-2) (Welchen und Gonzales, 2005). Dieses *cis*-Element wird von TFen erkannt, welche eine TCP-Domäne besitzen (Trémousaygue *et al.*, 2003). Die Regulation dieser TFen umfasst Gene, die in die mitochondriale oxidative Phosphorylierung involviert sind (Welchen und Gonzales, 2006).



Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 20	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	SITEIIATCYTC (2.7256e-07)	WGGYCCA -RGCCCA	 (PLACE)

Abbildung 40: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 20 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 21 beinhaltet 9 Motive. Eine geringe Ähnlichkeit des Sequenzlogos dieser Motivgruppe (Abbildung 41) wurde zum ABRE3-Element festgestellt. Dieses Element wird auch mit A3 bezeichnet und stammt aus dem HVA22-Genpromotor aus Gerste (*Hordeum vulgare*) (Shen und Ho, 1995). Dieses Element gehört zum ABA *response complex* 1 (ABRC1), welcher aus A3 und dem *coupling element* 1 (CE1) besteht (Shen *et al.*, 1996).

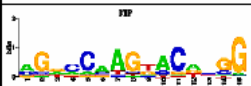

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 21	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Consensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	ABRE3HVA22 (5.2134e-06)	CCNNGTCTNGKNCK ---TGACGTGGC--	 (PLACE)

Abbildung 41: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 21 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 22 umschließt die drei Motive GG4_M2, 12N_M1 und 38H-2_M1. Der DB-Abgleich lieferte eine geringe Homologie des Sequenzlogos des Familienprofils zu einem Element, welches in Promotoren von Speicherproteinen von Raps (*Brassica napus*) vorkommt (Abbildung 42). Das *cis*-Element zeigt geringe Ähnlichkeit zu E-Box/ABRE-ähnlichen Sequenzen (Stålberg *et al.*, 1995).



Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 22	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	2SSEEDPROTBANAPA (6.3380e-05)	KTGTGTNNNGTNTGNNG -----GTGTTG----	

Abbildung 42: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 22 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Konsensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 23 besteht aus 7 Gruppenmitgliedern. In Abbildung 43 ist eine Homologie zu einem *cis*-Element im SBE(*starch-branching enzyme*)1-Gen aus Mais (*Zea mays*) aufgezeigt. Der dazugehörige Transkriptionsfaktor kontrolliert die Zucker-abhängige Genexpression im Endospermgewebe (Kim und Guiltinan, 1999).

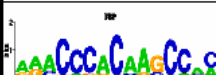
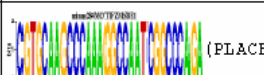
Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 23	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	minus284MOTIFZMSBE1 (2.4669e-07)	-----KNGGCTTGTGGGTYT----- TCTGGGCCGATTGGCCTTTGGGCTGCACG	

Abbildung 43: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 23 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Konsensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 24 besteht aus 56 Gruppenmitgliedern. Das Familienprofil zeigte eine eindeutige Homologie zur GCC-Box (Abbildung 44), an welche ERFs (*Ethylene response factors*) binden (Fujimoto *et al.*, 2000). Dieses regulatorische Element kommt in vielen PR-Genen wie z. B. PDF2.1 vor. Es steht mit der Ethylen- und Jasmonat-abhängigen Genexpression in Verbindung (Ohme-Takagi und Shinshi, 1995; Brown *et al.*, 2003).



Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 24	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	GCCCORE (1.6815e-08)	GSCGGCNS GGCGGC--	

Abbildung 44: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 24 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 25 besteht aus 5 Mitgliedern. Das Familienprofil in Abbildung 45 zeigte ein langes, relativ schwach konserviertes Sequenzlogo. Es wurde eine Homologie zum einem Promotorelement GRA(*GT rich activator*) des *rab17*-Gens aus Mais (*Zea mays*) detektiert (Busk *et al.*, 1997). Es handelt sich um ein ABA-responsives Gen (Busk und Pagès, 1998), welches bei Mais in Blättern, aber nicht im Embryo transkribiert wird (Busk *et al.*, 1997).

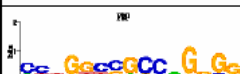

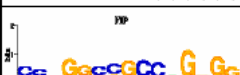

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 25	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Consensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	GRAZMRAB17 (5.238 6e-09)	MNNGKYSGCCWKGKGG --GGCGGCCAGTG--	
	GCC-box (5.8691e-05)	MNNGKYSGCCWKGKGG ----GCCGCC-----	

Abbildung 45: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 25 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im oberen Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Die Motivgruppe 26 besteht aus 4 Mitgliedern. Die größte Homologie des Sequenzlogos (Abbildung 46) fand sich zur Region 1, einer ABRE-ähnlichen Sequenz aus dem Reis Osem-Gen (Hattori *et al.*, 1995). Der bZIP-Faktor TRAB1 bindet an dieses *cis*-Element, interagiert mit VP1 und vermittelt eine ABA-induzierte Genexpression (Hobo *et al.*, 1999).

Das Alignment und der E-value weisen jedoch auf eine sehr geringe Ähnlichkeit der identifizierten Motive GG1_M1, GG12_M1, 22KK_M1 und 18C_M1 mit dem Region 1-Element hin.

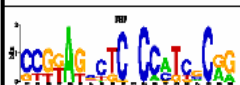
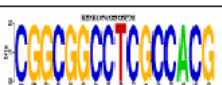
Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 26	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	REGION10SOSEM (7.5831e-05)	CYGNAGKGGNGAGNCTMCGG ----CGTGGCGAGGCCGCCG	 (PLACE)

Abbildung 46: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 26 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Die Motivgruppe 27 besteht aus 26 Gruppenmitgliedern. Abbildung 47 zeigt eine Homologie, die zur Box-1 aus dem Promotor des CHS(Chalcon Synthase)15-Gens aus der Bohne (*Phaseolus vulgaris*) besteht (Lawton *et al.*, 1991).

Weitere Homologien (Abbildung 47) bestehen zu einer Bindestelle des WRKY6 TF aus *Arabidopsis* (Robatzek und Somssich, 2002), sowie zur so genannten W-Box, an die allgemein TFen der WRKY-Familie binden (Yu *et al.*, 2001). Bei Bewertung der Alignments kann festgestellt werden, dass in dem Sequenzlogo des Familienprofils eindeutig eine W-Box vorliegt.

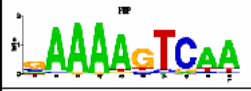

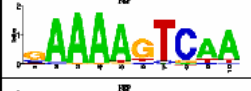



Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 27	Bezeichnung des ähnlichen cis-Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: cis-Element	Sequenzlogo des ähnlichen cis-Elementes (DB)
	BOX1PVCHS15 (4.5871e-07)	SAAAAGTCAA--- TAAAAGTTAAAAAC	 (PLACE)
	WRKY6_oneSite (1.5708e-06)	SAAAAGTCAA- --ATAGTCAAC	 (AthaMap)
	W-Box (8.4057e-06)	SAAAAGTCAA -----GTCAA	 (AGRIS)

Abbildung 47: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 27 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen cis-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das cis-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Konsensussequenzen des Familienprofils (oben) und des cis-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen cis-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. In den beiden unteren Alignments ist vom ähnlichen cis-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 28 besteht aus den zwei Motiven 30I-5_M1 und 31E_M2. Das Sequenzlogo zeigt in Abbildung 48 eine geringe Homologie zur T-Box. Diese befindet sich im GAP-B Genpromotor bei *Arabidopsis thaliana* (Chan *et al.*, 2001). GAP-B kodiert für die β -Untereinheit der plastidären Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase. Mutationen in der T-Box führen zu einer Reduktion der Licht-aktivierten Genexpression.

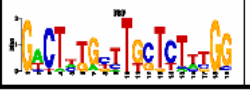

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 28	Bezeichnung des ähnlichen cis-Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: cis-Element	Sequenzlogo des ähnlichen cis-Elementes (DB)
	TBOXATGAPB (3.5779e-05)	CCAWAGAGCAARCANAGTC -----CAAAGT-	 (PLACE)

Abbildung 48: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 28 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen cis-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das cis-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Konsensussequenzen des Familienprofils (oben) und des cis-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen cis-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen cis-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 29 besteht aus den drei Motiven 27G-7_M1, 28D-1_M1 und 30I-7_M2. Es zeigte sich geringe Ähnlichkeit (Abbildung 49) zu einem minimalen Promotorelement im 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure Synthase (Acs)-Gen aus der Tomate (*Lycopersicon esculentum*). *In vitro* wurde nachgewiesen, dass eine Cystein-Protease an dieses Element bindet (Matarasso *et al.*, 2005). Eine weitere Ähnlichkeit des Sequenzlogos des Familienprofils (Abbildung 49) wurde zu einem Promotorelement (SORLREP3) detektiert, welches in Gen-Promotoren vorkommt, die bei Licht eine verstärkte Genexpression aufweisen (Hudson und Quail, 2003).





Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 29	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	LECPLEACS2 (6.0807e-06)	CTCTATATWYAMTANM ----ATATTTTA-----	
	SORLREP3 (8.2007e-05)	KNTAKTWRWATATAGAG -----ATATATACA--	

Abbildung 49: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 29 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. In den Alignments sind von den homologen *cis*-Elementen die revers komplementären Sequenzen vom jeweiligen Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 30 besteht aus 28 Gruppenmitgliedern. Eine hohe Ähnlichkeit zeigte dieses Familienprofil in Abbildung 50 zu der Consensus-Sequenz von TL1, welche in Promotoren von 13 NPR1-responsiven Genen vorkommt (Wang *et al.*, 2005).



Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 30	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	TL1ATSAR (1.3721e-11)	YtNCTTCYTCW- -TTCTTCTTCAG	

Abbildung 50: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 30 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 31 beinhaltet die drei Motive 12i_M2, 29OO_M3 und 22AAA_M1. Das Familienprofil zeigte ein sehr schwach konserviertes Sequenzlogo (Abbildung 51). Es besteht eine geringe Homologie zu einer XBP1-ähnlichen BS, welche im UPRE(*unfolded protein response element*) in *Arabidopsis* vorkommt (Oh *et al.*, 2003). Dieses Element spielt eine Rolle bei zellulären Prozessen (Martínez und Chrispeels, 2003).

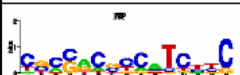

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 31	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	UPRE2AT (4.8889e-08)	GNNGANGRSGYSGNG ---GATGACGTGG--	

Abbildung 51: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 31 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 32 besteht aus 21 Motiven. Das Familienprofil zeigte eine Ähnlichkeit zu einem CT-reichen Element (Abbildung 52), welches *downstream* des TSS der CaMV (*Cauliflower mosaic virus*) 35SRNA vorkommt (Pauli *et al.*, 2004).



Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 32	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	CTRMCAV35S (9.6713e-07)	GRAGAGAGGG- --AGAGAGAGA	

Abbildung 52: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 32 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 33 umfasst 7 Gruppenmotive. Homologien des Sequenzlogos (Abbildung 53) traten zu einem *GA octodinucleotide repeat* auf, welches im vierten Intron des Gerste (*Hordeum vulgare*) Bkn3-Gens vorkommt. Es ist eine BS für den GAGA-Bindungsfaktor BBR (Santi *et al.*, 2003). Eine weitere Ähnlichkeit (Abbildung 53) findet sich in einer Teilsequenz des Familienprofils zu einer BS von dem TF MYB44 aus *Arabidopsis* (Kirik *et al.*, 1998).

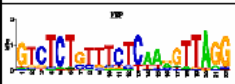
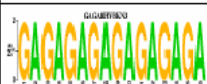
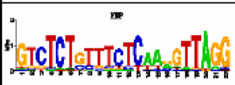

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 33	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	GAGA8HVBKN3 (4.4997e-06)	GTCTCTGTTTCTCAANGTTAGG -TCTCTCTCTCTCTCTC-----	 (PLACE)
	AtMYB44_twoSite (5.2192e-05)	CCTAACNTTGAGAAACAGAGAC -CTAACT-----	 (AthaMap)

Abbildung 53: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 33 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Konsensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. In den Alignments sind von den homologen *cis*-Elementen die revers komplementären Sequenzen vom jeweiligen Sequenzlogo dargestellt.

Die Motivgruppe 34 umfasst das Motiv 12g_M1 und das Motiv 16LL_M1. Es besteht eine Ähnlichkeit des gemeinsamen Sequenzlogos zu Bindestellen der E2F TFen (Abbildung 54). E2Fb bindet an Sequenzen, die im Promotor des S-Phase regulierten CDC6-Gens aus *Arabidopsis* binden (de Jager *et al.*, 2001). Dieses CDC-Gen ist Mitglied einer Multigenfamilie.

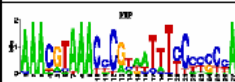

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 34	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	E2Fb (2.7646e-05)	TTRGSRRGAAATWNCGRGTTTACGTTT ---NGCGGGAAAW-----	 (AthaMap)

Abbildung 54: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 34 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Konsensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt.

Die Motivgruppe 35 besteht aus den zwei Motiven 27A-6_M1 und 27F-2_M1. Eine Teilsequenz des Familienprofils (Abbildung 55) wies eine 100%ige Übereinstimmung zu einer Bindestelle eines E2F-TFs auf. Für E2F TFen wurde in Reis (*Oryza sativa*) gezeigt, dass sie wichtige Regulatoren bei der Proliferation sind (Kosugi und Ohashi, 2002).

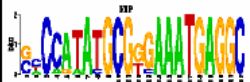

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 35	Bezeichnung des ähnlichen cis-Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: cis-Element	Sequenzlogo des ähnlichen cis-Elementes (DB)
	E2F (1.5674e-09)	GCCTCATTTCCTCGCATATGGNS -----TTTCCCGC-----	

Abbildung 55: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 35 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt.

Motivgruppe 36 besteht aus vier Motiven. Das Familienprofil von Gruppe 36 zeigte eine sehr geringe Ähnlichkeit zu einem *RY repeat motif* (Abbildung 56), welches in der Promotorregion des Glycinin (Globulin) Gens (Gly2) der Sojabohne (*Glycine max*) vorkommt (Lelievre *et al.*, 1992).



Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 36	Bezeichnung des ähnlichen cis-Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: cis-Element	Sequenzlogo des ähnlichen cis-Elementes (DB)
	RYREPEATGMGY2 (1.6710e-04)	CCCGANGCATWATGCNTCGGG -----ATGCATG---	

Abbildung 56: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 36 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

Motivgruppe 37 umfasst die zwei Motive 24a_M3 und 38V_M2. Das Sequenzlogo des Familienprofils zeigt in Abbildung 57 eine geringe Homologie zur SEF4 (*soybean embryo factor 4*) Bindungssequenz. Diese Consensus-Sequenz befindet sich im Promotor des *beta*-Conglycinin-Gens der Sojabohne (*Glycine max*) (Lessard *et al.*, 1991).

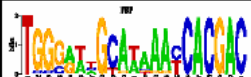

Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 37	Bezeichnung des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (E_value)	Alignment der Konsensussequenzen Oben: Familienprofil Unten: <i>cis</i> -Element	Sequenzlogo des ähnlichen <i>cis</i> -Elementes (DB)
	SEF4MOTIFGM7S (4.1924e-06)	TGGGRWNGCAMAAYCACGAC -----YAAAAAY-----	

Abbildung 57: In Spalte 1 ist das Sequenzlogo des Familienprofils von Gruppe 37 dargestellt. In Spalte 2 befindet sich die Bezeichnung des ähnlichen *cis*-Elementes, welches durch einen DB-Abgleich detektiert wurde. Aufgeführt ist immer das *cis*-Element mit der größten Homologie zum Familienprofil. Zusätzlich ist der E_value angegeben. In Spalte 3 liegt ein Alignment der Consensussequenzen des Familienprofils (oben) und des *cis*-Elementes (unten) vor. In Spalte 4 ist das Sequenzlogo vom ähnlichen *cis*-Element dargestellt, die dazugehörige DB, aus der dieses Ergebnis stammt, ist aufgeführt. Im Alignment ist vom ähnlichen *cis*-Element die revers komplementäre Sequenz vom Sequenzlogo dargestellt.

3.6. Zusammenfassung der Motivgruppen, bei denen *cis*-Elemente bekannter TF-Familien identifiziert wurden

Nur eine geringe Anzahl an Motivgruppen zeigte bei den Homologievergleichen der Familienprofile zu den Datenbankinhalten der DB PLACE, AGRIS und AthaMap eine große Übereinstimmung zu bereits bekannten *cis*-Elementen oder TF-BS von TF-Familien (3.5.). Die Abbildung 58 zeigt eine Übersicht der TF-Familien im erstellten STAMP-Baum aller 407 Motive, welche mit großer Wahrscheinlichkeit aufgrund der Alignments der Familienprofile und der ermittelten E-values eine Bindungssequenz der aufgezeigten TF-Familien enthalten (vgl. 3.5.).

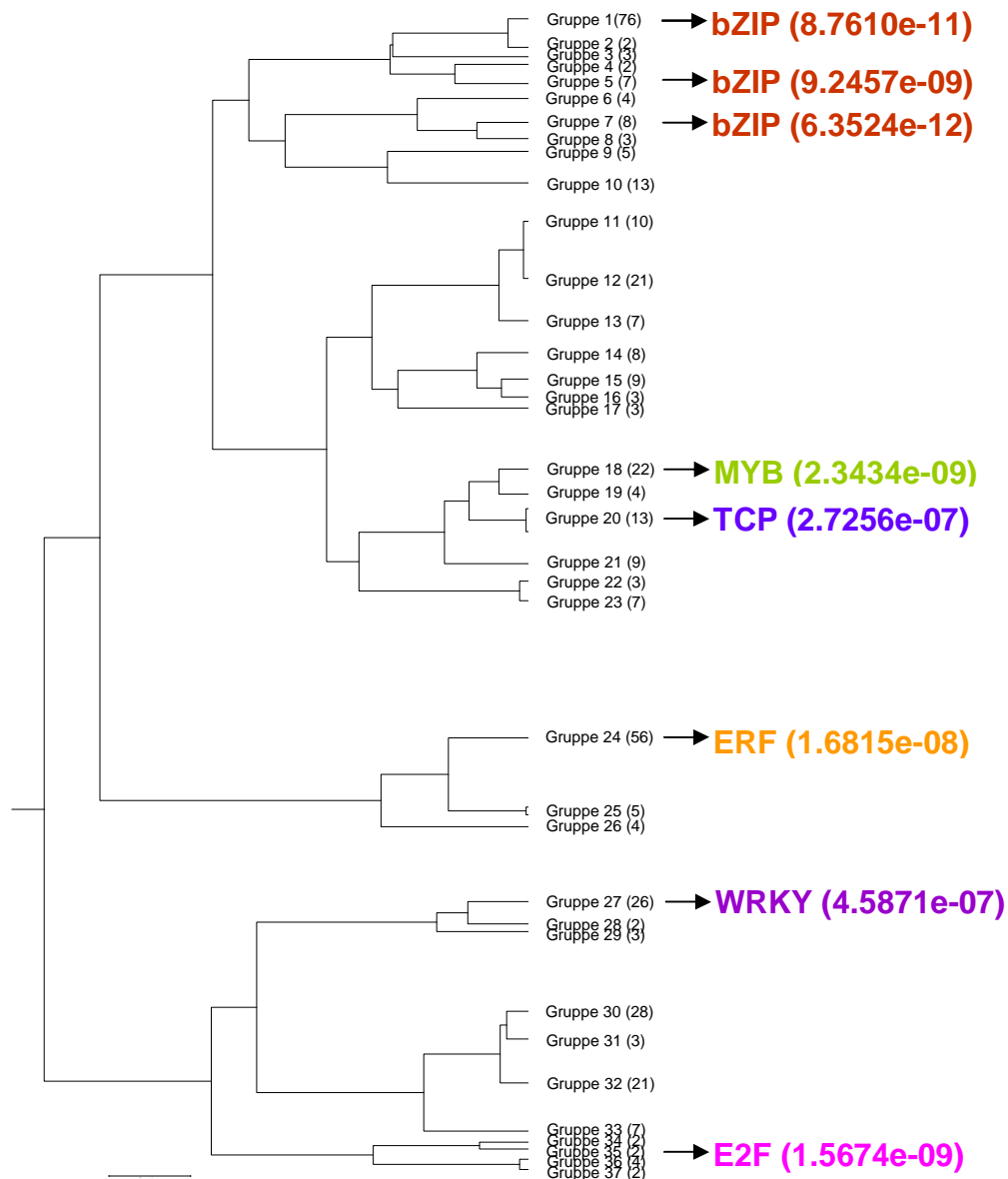


Abbildung 58: Klassifizierung der 407 Motive zu 37 Motivgruppen und Darstellung der Zugehörigkeit einzelner Motivgruppen aufgrund der Homologieergebnisse zu Bindungssequenzen bestimmter TF-Familien (E-value). Dabei treten die TF-Familien bZIP, MYB, TCP, ERF, WRKY und E2F auf.

Die Abbildung 58 gibt wieder, dass die Motivgruppen 1, 5 und 7 als Sammlung von potentiellen Bindungsstellen von bZIP Faktoren identifiziert wurden. Die Motivgruppe 18 zeigte große Homologie zu MYB-Bindungssequenzen. Gruppe 20 beinhaltet potentielle *cis*-Elemente, die von Proteinen mit einer

TCP-Domäne erkannt werden. Die bei der Pathogenantwort bekannten Bindungsstellen von ERFs sind in der Motivgruppe 24 vorzufinden. Ähnlichkeiten zur W-Box, an welche WRKY-Faktoren binden, zeigte die Motivgruppe 27. Eine hohe Ähnlichkeit zu Sequenzen, die denen von E2F TF Bindungsstellen entsprechen, war in der Motivgruppe 35 vorhanden. Wie die Abbildung 58 zeigt, weisen zahlreiche Motivgruppen keine signifikanten Homologien zu Bindungsstellen bekannter Transkriptionsfaktoren auf. Das kann mit dem Vorhandensein heterogener Motive innerhalb einer Motivgruppe begründet werden bzw. ist auf die geringe Konserviertheit der Einzelmotive zurückzuführen (vgl. Anhang Digital D auf CD-ROM). Eine weitere Erklärung ist, dass es sich bei vielen identifizierten Motiven und dementsprechend Motivgruppen um bislang nicht identifizierte und analysierte *cis*-Elemente bzw. TF-BS handelt.

3.7. Identifizierung von Einzelmotiven für die experimentelle Untersuchung am Beispiel von 18H_M2

Das Ziel dieser Arbeit war es, neue bisher unbekannte funktionelle *cis*-Elemente zu identifizieren. Dazu wurden Einzelmotive ausgewählt, die aus möglichst vielen verschiedenen Motivgruppen stammen und somit untereinander nicht nah verwandt sind. Ein Kriterium war außerdem, dass die ausgewählten Einzelmotive ein hoch konserviertes Sequenzlogo aufwiesen. Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Auswahl eines Einzelmotivs für die experimentelle Untersuchung war, dass das Motiv keine Ähnlichkeit zu Bindungssequenzen von Transkriptionsfaktoren aufwies, die einen offensichtlichen Pathogenbezug besitzen. Außerdem sollte keine Homologie zu *cis*-Elementen mit einem bekannten Pathogenbezug auftreten. Diese Information ist nicht immer den Familienmotiven zu entnehmen. Um die Ähnlichkeit der 407 identifizierten Einzelmotive zu bekannten *cis*-Elementen oder TF-BS zu untersuchen, wurden über den Webserver STAMP alle Einzelmotive mit den DB-Einträgen der DB PLACE, AGRIS und AthaMap (2.1.2.5.) verglichen. Dazu wurde eine Datei mit den gewichteten Matrizen der identifizierten Motive und deren Bezeichnung verwendet (Anhang Digital B auf CD-ROM). Die Ergebnisse befinden sich in Anhang Digital D auf CD-ROM.

Die Kriterien treffen unter anderem auf die Einzelmotive 3C_M1, 12c_M1, 12EE_M1, 12r_M1, 15AAA_M1, 15CCC_M1, 18H_M2, 20a_M1, 21S_M1, 22AAA_M1, 24F_M1, 30A-8_M1, 30I-8_M1, 37C_M1 und 37E_M1 zu, aus denen erste Einzelsequenzen für experimentelle Untersuchungen ausgewählt wurden (siehe 3.8.).

Das Einzelmotiv 18H_M2 wies eine hohe Konservierung auf. Die Abbildung 59 zeigt das Ergebnis der vergleichenden Analyse mit den verschiedenen DB für das Motiv 18H_M2, um zu analysieren, ob das Einzelmotiv eine Homologie zu *cis*-Elementen bzw. TF-BS mit Pathogenbezug aufweist.

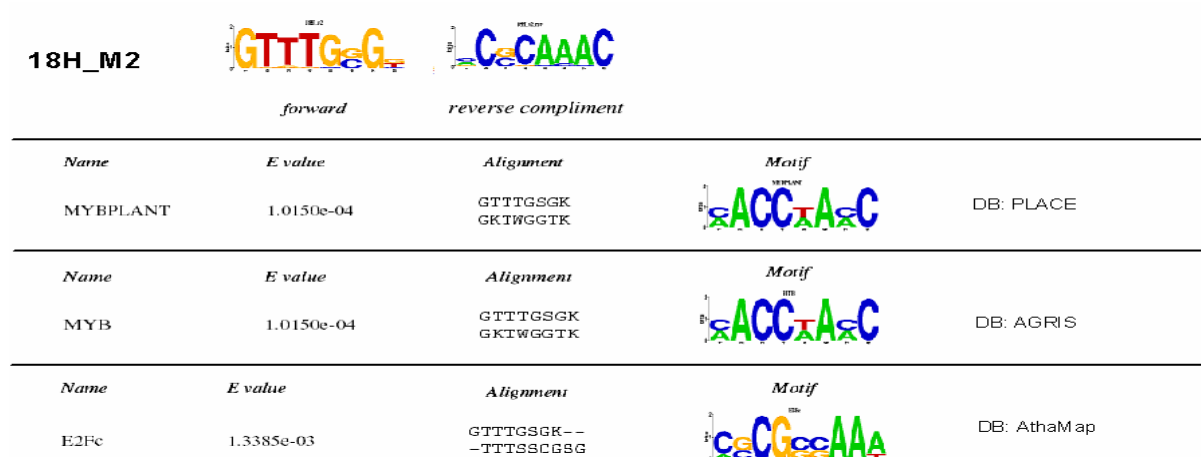


Abbildung 59: Vergleich des Motivs 18H_M2 mit den Inhalten der Datenbanken PLACE, AGRIS und AthaMap über den Webserver STAMP. Oben ist mit 2 Sequenzlogos das Motiv 18H_M2 in der identifizierten Orientierung, sowie in der revers komplementären Orientierung dargestellt. In den drei Zeilen darunter befinden sich die Übereinstimmungen zu den *cis*-Elementen/TF-BS in den drei überprüften DB. Mit *Name* ist der Name des identifizierten *cis*-Elementes oder der TF-BS bezeichnet. Der E-value gibt an, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass die vorhandene Ähnlichkeit zufällig ist. Das *Alignment* zeigt einen Sequenzvergleich der abgeleiteten Consensussequenz des Motivs 18H_M2 (oben) zur Konsensussequenz des *cis*-Elementes/TF-BS der DB (unten). Ganz rechts in der jeweiligen Zeile ist ein Sequenzlogo des *cis*-Elementes/TF-BS gezeigt. In der ersten Zeile befindet sich der Abgleich zur DB PLACE, die zweite Zeile gibt den Vergleich zur DB AGRIS wieder und die letzte Zeile zeigt die Übereinstimmung zur DB AthaMap.

Ein Vergleich des Motivs 18H_M2 mit den Datenbanken PLACE und AGRIS lieferte das gleiche Ergebnis. Beide Male wurde eine Ähnlichkeit zu einem *cis*-Element detektiert, das die Bindungsstelle eines MYB-Faktors darstellt (Abbildung 59). Das Alignment und auch der hohe E-value weisen auf eine

geringe Ähnlichkeit hin. In der AthaMap wurde als höchste Übereinstimmung eine E2Fe-Bindungsstelle aufgezeigt, jedoch auch mit einem sehr hohen E-value. Demzufolge konnte für dieses Motiv keine Übereinstimmung zu bekannten *cis*-Elementen oder TF-Bindungsstellen mit Pathogenbezug abgeleitet werden. Das Einzelmotiv 18H_M2 erfüllte die Kriterien, sowohl in einer Motivgruppe vorzukommen, die keine große Ähnlichkeit zu einem regulatorischen Element aufwies, als auch im Einzelmotiv nur eine geringe Übereinstimmung zu einer MYB-Bindesequenz zu zeigen, die zudem keinen Pathogenbezug besaß.

Diese Homologieanalysen der Einzelmotive (und Motivgruppen, 3.5.) bildeten eine Grundlage für die Auswahl von Motiven und dazugehörigen Einzelsequenzen, welche in die experimentelle Untersuchung einfließen sollten.

3.8. Auswahl von Einzelsequenzen für die experimentelle Analyse am Beispiel des Motivs 18H_M2

Für die experimentelle Untersuchung hinsichtlich der Identifizierung funktioneller *cis*-Elemente sollte für das Motiv 18H_M2 eine Einzelsequenz ausgewählt werden. Für diese Auswahl musste das BEST-Ergebnis weiter ausgewertet werden.

Folgende Kriterien wurden für die Auswahl einer Einzelsequenz für die experimentelle Analyse festgelegt:

- Das Motiv kommt in möglichst vielen Promotoren der koregulierten Gene vor (viele Einzelsequenzen bilden das Motiv).
- Die Einzelsequenz weist eine große Ähnlichkeit zur Consensussequenz des Motivs auf.
- Die Einzelsequenz liegt nah am TSS.
- Es tritt eine geringe Ähnlichkeit der ausgewählten Einzelsequenz zu bekannten *cis*-Elementen oder TF-BS auf, welche einen experimentell bestätigten Pathogen-Bezug besitzen.

Das Motiv 18H_M2 resultierte aus einer Matrize, die sich aus verschiedenen Einzelsequenzen aus den Promotoren der koregulierten Gene zusammensetzte. Dabei muss eine Einzelsequenz nicht in allen untersuchten Promotoren dieser koregulierten Gene vorkommen. Das Motiv 18H_M2 stammt aus der PA-Abfrage mit den Stimuli *B. cinerea* und NPP1 und die Abfrage ergab 21 koregulierte Gene (Anhang 8.7.).

Zur weiteren Auswertung des BEST-Ergebnisses wurde das Programm *output_best_KWS.pl* (Wiebke Ahrend, persönliche Mitteilung) verwendet. Es ermittelte den Anteil an koregulierten Genen, die einen TSS besitzen. Weiter wurde der Anteil an Genen bestimmt, welche ein oder mehrere Einzelsequenzen des Motivs trugen. Das Programm errechnete, aus wie vielen Einzelsequenzen das Motiv insgesamt geformt wurde. Darüber hinaus wurden die Positionen der Motive nach ihrer Entfernungslage zum jeweiligen TSS sortiert. Mit Hilfe des Programmes wurde für das Motiv 18H_M2 das in Abbildung 60 dargestellte Ergebnis erhalten.

Anzahl der koregulierten Gene (insgesamt): 21
 Anzahl der koregulierten Gene (mit TSS) : 14
 Anzahl der Motiv bildenden Gene (mit TSS): 12
 Anzahl der Motiv bildenden Sequenzen : 16
 Anteil der Motiv bildenden Gene : 0.86

Matrize :

A	C	G	T	Konsensus-Sequenz
				↓
0	0	16	0	G
0	0	1	15	T
0	0	2	14	T
0	0	1	15	T
0	1	15	0	G
0	8	8	0	c
0	0	16	0	G
0	3	7	6	g
1	7	4	4	c

Legende:

AGI : Genidentifikationsnummer
 O : Orientierung des Gens
 o : Orientierung des Motivs
 Mo : Sequenz des gefundenen detektierten des Motivs
 sta : Startposition des Motivs, relativ zum TSS
 rM : revers komplementäre Sequenz des Motivs
 end : Endposition des Motivs, relativ zum TSS
 part : relativer Vergleich zur Konsensus-Sequenz
 n : Anzahl der Motive pro betrachteten Promotor

AGI	O	o	Mo	sta	rM	end	part	n
At2g33710.1	R	f	GTGTGCGTC	-44	GACGCACAC	-36	0.78	1
At1g70170.1	F	r	GTTTGCGTT	-98	AACGCAAAC	-90	0.78	3
At1g70170.1	F	r	GTTGGCGGG	-111	CCCGCAAAC	-103	0.78	3
At1g70170.1	F	r	GTTTGCGTG	-138	CACGCAAAC	-130	0.78	3
At2g35980.1	F	f	GTTTGGGGC	-152	GCCCCAAAC	-144	0.89	1
At2g31945.1	F	r	GGTTGGGGC	-280	GCCCCAACC	-272	0.78	1
At3g02550.1	R	f	GTGTGGGCC	-385	GGCCACAC	-377	0.67	1
At3g21520.1	F	r	GTTTGCGGT	-629	ACCGCAAAC	-621	0.89	1
At3g13650.1	F	r	GTTTGGGTG	-761	CACCCAAAC	-753	0.67	1
At5g64905.1	F	f	GTTTGGGGG	-785	CCCCCAAAC	-777	0.78	1
At5g24110.1	R	f	GTTTGCGTT	-816	AACGCAAAC	-808	0.78	2
At5g24110.1	R	f	GTTTGCGTT	-832	AACGCAAAC	-824	0.78	2
At5g51060.1	R	r	GTTTGGGCC	-888	GGCCCAAAC	-880	0.78	2
At5g51060.1	R	r	GTTTGGGCC	-912	GGCCCAAAC	-904	0.78	2
At1g07160.1	R	f	GTTTCCGGC	-977	GCCGAAAC	-969	0.89	1
At2g29470.1	R	f	GTTTGGGGA	-999	TCCCCAAAC	-991	0.78	1

Abbildung 60: Ergebnis des Auswertungsprogramms *output_best_KWS.pl* für das identifizierte Motiv 18H_M2. Es beinhaltet allgemeine Angaben wie z. B. die Anzahl an koregulierten Genen (mit TSS). Es bestimmte die Anzahl der Motiv-bildenden Sequenzen. Eine Legende erklärt das eigentliche Ergebnis des Auswertungsprogramms: Sortierung und Identifizierung der Motiv-bildenden Einzelsequenzen mit Position, Anzahl und Orientierung zum jeweiligen TSS der einzelnen Gene.

Als Ergebnis wurde festgestellt, dass in 12 Promotoren der 14 Gene (mit TSS) 1-3 Einzelsequenzen des Motivs vorkommen (Abbildung 60). Der Anteil an Motiv-tragenden Genpromotoren liegt demnach bei 86 Prozent. Insgesamt bilden 16 Einzelsequenzen das Motiv.

Die Einzelsequenz 18H_M2_S1 wurde aus dem Promotor des Gens At1g70170 ausgewählt. Das Gen kodiert für eine Matrixmetalloproteinase und trägt 3 Einzelsequenzen im Promotorbereich (Abbildung 61). Als zu testende Sequenz (18H_M2_S1) wurde diejenige Sequenz gewählt, die die nächste Position *upstream* zum TSS besaß (Abbildung 61; -90bp). Alle drei Einzelsequenzen aus diesem Promotor weisen eine Ähnlichkeit von 78% (Abbildung 60, *part 0.78*) im Vergleich zur Consensussequenz des Motivs 18H_M2 auf (Abbildung 60).

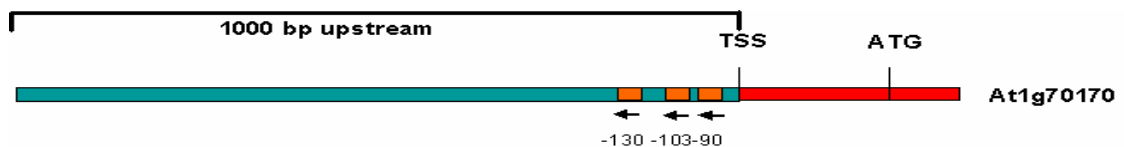


Abbildung 61: Schematische Darstellung der drei im Promotor des Gens At1g70170 befindlichen Einzelsequenzen, welche dem Motiv 18H_M2 zugeordnet werden.

Eine weitere Untersuchung betraf die Charakterisierung des betroffenen Gens. Matrix-Metalloproteinasen besitzen eine Rolle bei Abwehrantworten bei Säugern auf Pathogenbefall. Das Enzym produziert antimikrobielle Peptide. In *Arabidopsis* gibt es eine Matrix-Metalloproteinase(MMP)-Familie, wobei bislang fünf Mitglieder identifiziert wurden (Maidment *et al.*, 1999). Mutanten zeigen späte Blühinduktion, Degradation von Chlorophyll und eine frühe Seneszenz. Den Proteinen wird daher eine Rolle bei Wachstum und Entwicklung zugeschrieben und eine besondere Bedeutung beim Blühprozess und der Seneszenz.

Für eine experimentelle Untersuchung wurde die ausgewählte Einzelsequenz 18H_M2_S1 (Abbildung 61; -90bp) um Randsequenzen aus der natürlichen Promotorsequenz erweitert, um eine Gesamtlänge von 26nt zu erreichen (Abbildung 62). Dazu kamen Linkersequenzen (kleingeschrieben), welche für die Klonierung (2.3.) notwendig waren.

5' ctagtCAACACAAA**ACGCAAACGCAGACCTC**tctag 3' 18H_M2_S1

Abbildung 62: Einzelsequenz von 18H_M2_S1 in 5'→3'Richtung. Die Motivsequenz von 18H_M2 ist fett dargestellt und um Randsequenzen aus der natürlichen Promotorsequenz ergänzt. Mit Kleinbuchstaben sind die erforderlichen Linkersequenzen angegeben.

Anhand dieser Sequenz wurde in zwei Datenbanken nach Homologien zu bekannten *cis*-Elementen bzw. zu Transkriptionsfaktorbindungsstellen gesucht, um erneut Homologien zu bekannten *cis*-Elementen bzw. Transkriptionsfaktorbindungsstellen zu identifizieren.

Mit der AthaMap Datenbank konnten innerhalb der Sequenz 18H_M2_S1 keine vollständigen potentiellen Bindungsstellen identifiziert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

In der PLACE-Analyse konnten drei verschiedene Kernsequenzen detektiert werden (Abbildung 63). Dabei wurde eine Übereinstimmung (CDA-1) zu einem Bestandteil des *dark response element f* (DtRE f), eines Chlorophyll a/b bindenden Proteins (CAB2) aus *A. thaliana* identifiziert (Maxwell *et al.*, 2003). Weiter wurde eine Homologie zur Kernsequenz einer RAV1(A)-Bindungsstelle aufgezeigt (Kagaya *et al.*, 1999), welcher für die DNA-Bindung allerdings noch eine zweite Erkennungssequenz benötigt. Es wurde außerdem eine Homologie zu einer W-Box aus dem Promotor eines Ethylen-responsiven Gens (WBOXNTERF3) aus *Nicotiana tabacum* detektiert, welche eine potentielle Bindungsstelle eines WRKY-Faktors darstellt.

18H_M2_S1

	ctagtCAACACAAA ACGCAAAC GCAGACCTCtctag
CDA-1CAAACG.....
RAV1-ACAACA.....
WBOXNTERF3	..agtCA.....

Abbildung 63: Abgleich der Einzelsequenz 18H_M2_S1 mit der Datenbank PLACE und Identifizierung von drei homologen Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren.

Die aufgezeigten Homologien zu Bindungsstellen von bekannten Transkriptionsfaktoren betrafen bis auf die CDA-1 Bindungssequenz, welche zudem keinen Pathogenbezug besaß, nicht die identifizierte Kernsequenz des Motivs 18H_M2 (Abbildung 63). Deshalb wurde diese Einzelsequenz für eine experimentelle Untersuchung ausgewählt.

Für die Auswahl von insgesamt 17 Einzelsequenzen wurden die Kriterien beachtet, dass die zugrunde liegenden Einzelmotive sehr konserviert waren und in verschiedenen Motivgruppen vorkamen (nicht nah verwandt). Die Einzelmotive kamen in den Promotoren möglichst vieler koregulierter Gene vor. Über die STAMP-Analyse wurde festgestellt, dass die Motivgruppe, das Einzelmotiv und die ausgewählte Einzelsequenz keine oder sehr geringe Homologien zu bekannten *cis*-Elementen bzw. TF-BS mit Pathogenbezug aufwiesen. Die ausgewählten Einzelsequenzen zeigten zudem eine hohe Übereinstimmung zur Consensussequenz des Motivs und lagen im ausgewählten Promotor möglichst nah am TSS.

Tabelle 11 zeigt die insgesamt 17 ausgewählten Einzelsequenzen. Die Bezeichnung _S1 bzw. _S2 bezieht sich darauf, dass eine bzw. eine zweite Einzelsequenz ausgewählt wurde. Es ist die Genidentifikationsnummer (AGI) des Gens aufgeführt, aus dem die Einzelsequenz stammt. Außerdem ist die Position des Motivs relativ zum TSS im Promotorbereich des entsprechend ausgewählten Gens angegeben. Die 17 Einzelsequenzen stammen aus 12 verschiedenen Motivgruppen.

Tabelle 11: Auflistung der 17 ausgewählten Einzelsequenzen. Die Bezeichnung setzt sich aus der Abfrage z.B. 3C, der Motivzahl z. B. M1 und der ausgewählten Sequenz z. B. S1 zusammen.

Bezeichnung	Gen	Motiv-Position relativ zum TSS	Motiv- Gruppe	Ausgewählte Einzelsequenz (5'→3')
3C_M1_S1	At3g51440	-291bp	11	TTTGATAC CGGTTACGGTTA AATTAACG
12c_M1_S1	At1g21100	-86	4	TCTACTAGAG GGCCATTAGG ACCGGCAT
12EE_M1_S1	At5g44420	-681	32	TAGGTT CCTGCCCTCTCCG TTCTCTCC
12EE_M1_S2	At4g39980	-57	32	TCGAA ACCAACCCTCTCC CTTATAAA
12r_M1_S1	At1g73480	-43	32	CAATCTACT CGTCTCTTCT CTTACAT
15AAA_M1_S1	At2g40140	-193	11	GACTTTT GACCTAAACC ATTTCCAT
15CCC_M1_S1	At1g27730	-239	21	CACAC ACGTGTACTAGG TCAAACCA
18H_M2_S1	At1g70170	-90	12	CAACACAAA ACGCAAAC GCAGACCTC
20a_M1_S1	At5g04340	-932	15	TTAGAAGT GGCTCGAGT GTTCTACTT
21S_M1_S1	At2g14610	-9	14	AAGCGATGTT ACGAACCC CAAAATC
22AAA_M1_S1	At2g40000	-63	31	TTTTT CTCGTCCCCAT CCTCTATCC
24F_M1_S1	At2g40750	-195	7	TCATCAAT GTGACATA AAGCAAAGCT
30A-8_M1_S1	At3g49620	-509	24	GCAA ACTAACGCCGGCGG CCGCTTTG
30I-8_M1_S1	At5g12930	-791	27	ACAACAGAC GACTTTT CATAATTCA
30I-8_M1_S2	At1g26390	-73	27	CTATATGAC AAAAGTCAA ACATAAA
37C_M1_S1	At3g51440	-121	20	AGAAAAATAT TGGGCCT ACTGGGAA
37E_M1_S1	At2g39200	-70	12	CGATA AACTTGCGAAAC CCTAAAA

3.9. Auswahl von zwei Einzelsequenzen am Beispiel des Motivs 30I-8_M1

Das Motiv 30I-8_M1 besitzt eine so hohe Konservierung, dass in allen Promotoren der koregulierten Gene, welche das Motiv tragen, die gleiche Kernsequenz auftritt. Um zu untersuchen, inwiefern die ergänzten Randsequenzen aus der natürlichen Promotorsequenz, die zusätzlich kloniert werden, einen Einfluss auf eine potentielle Induzierbarkeit besitzen, wurden in diesem Fall zwei Einzelsequenzen aus zwei verschiedenen Promotoren ausgewählt. Um die Unterschiede darzustellen, wurde ein Datenbankabgleich mit bekannten *cis*-Elementen in der DB PLACE durchgeführt. Abbildung 64 gibt die Übereinstimmungen der zwei Einzelsequenzen 30I-8_M1_S1 und 30I-8_M1_S2 mit den identifizierten *cis*-Elementen wieder.

30I-8_M1_S1

	ctagtACAACAGAC GACTTTT CATAATTCatctag
-300ELEMENTACTTTTCA.....
CACTFTPPCA1	..agtA.....
CURECOREZM	...gtAC.....
DOFCOREZMCTTT.....
MYBCORECAACNG.....
RAV1ATCAACA.....

30I-8_M1_S2

	ctagtCTATATGAC AAAAGT CAAACATAAAatctag
ARR1ATAAtcn..
BIHD10STGACA.....
DOFCOREZMAAAG.....
WBBOXPCWRKY1YGTCAAA.....
WBOXATNPR1GTCAA.....
WBOXHVISI1AGTCA.....
WBOXNTERF3AGTCY.....
WRKY710STGAC.....
WRKY710SGTCA.....

Abbildung 64: Ergebnisse der PLACE-Analyse von den Einzelsequenzen auf Homologievorkommenisse zu *cis*-Elementen bekannter TFen. Oben für die Einzelsequenz 30I-8_M1_S1 und unten für die Einzelsequenz 30I-8_M1_S2. Die Kernsequenz des Motivs (30I-8_M1) befindet sich bei der _S1-Sequenz in *forward*-Orientierung, bei der _S2-Sequenz in *reverse*-Orientierung zum jeweiligen TSS.

Bei der Sequenz 30I-8_M1_S1 gibt es eine Homologie zu einem -300-Element aus der Gerste (*Hordeum vulgare*), welches eine Endosperm-spezifische Expression vermittelt (Thomas und Flavell, 1990). Weiter tritt eine Ähnlichkeit zum CACT-Element aus *Flaveria trinervia* (Gowik *et al.*, 2004) auf. Es ist eine Teilkomponente eines *cis*-regulatorischen Elementes des *ppcA1*-Gens (Phosphoenolpyruvat Carboxylase). Darüber hinaus wurde die Kernsequenz (CURE-CORE) des *copper-response element* aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Kropat *et al.*, 2005) detektiert. Die Einzelsequenz 30I-8_M1_S1 zeigte eine Homologie zur Kernsequenz einer DOF- und einer MYB-Bindungssequenz (Urao *et al.*, 1993). Weiter kam eine Ähnlichkeit zur RAV-1 Bindestelle vor, welche eine der beiden Erkennungssequenzen des RAV1 TFs aus *Arabidopsis* darstellt (Kagaya *et al.*, 1999).

Bei der Einzelsequenz 30I-8_M1_S2 wurde eine Homologie zu einer Bindungsstelle von ARR1 aus *Arabidopsis* detektiert. ARR1 und ARR2 fungieren als transkriptionelle Aktivatoren (Sakai *et al.*, 2000). Die Sequenz wurde ursprünglich im Promotor des *non-symbiotic haemoglobin-2* (NSHB) Gens gefunden (Ross *et al.*, 2004). Die TFen sind Cytokinin-reguliert (Ross *et al.*, 2004). Eine weitere Ähnlichkeit wurde zu einer BELL Homeodomän TF Bindungsstelle (BIHD1) detektiert, welche in Reis (*Oryza sativa*) beschrieben wurde (Luo *et al.*, 2005). Weiter zeigte sich eine Homologie zu einer DOF-Bindungssequenz. Bei den übrigen Homologien handelt es sich um Bindungsstellen von W-Boxen, welche aus verschiedenen Pflanzenarten stammen, so z. B. Petersilie (*Petroselinum crispum*), Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), Gerste (*Hordeum vulgare*), Tabak (*Nicotiana tabacum*) und Reis (*Oryza sativa*), an welche WRKY TFen binden.

Beim Motiv 12EE_M1 wurden ebenfalls zwei Einzelsequenzen ausgewählt. Da beide Sequenzen experimentell nicht funktionell waren, wird auf eine ausführliche Darstellung der Auswahl verzichtet. 17 Einzelsequenzen von 15 unterschiedlichen Motiven wurden insgesamt nach den oben aufgeführten Kriterien ausgewählt (3.8). Dabei wurden die ausgewählten Einzelsequenzen, wie bei den Einzelsequenzen 18H_M2_S1, 30I-8_M1_S1 und 30I-8_M1_S2 schon beschrieben, um Randsequenzen aus der natürlichen Promotorsequenz ergänzt, um eine Gesamtlänge von 24-28nt zu erhalten.

Die in Tabelle 11 (Seite 119) aufgeführten Einzelsequenzen wurden mit *SpeI* und *XbaI* Linkern *in vitro* bei der Firma OPERON synthetisiert (2.1.10.) und in das ebenfalls mit *SpeI* und *XbaI* verdaute Plasmid pBT10-GUS kloniert (2.3.), welches das β -Glucuronidase Reportergen trägt. Nach Überprüfung der Orientierung mittels PCR wurden alle Elemente dimerisiert, tetramerisiert und sequenziert.

3.10. Analyse der posttranskriptionellen Regulation der den 17 ausgewählten Einzelsequenzen zugrunde liegenden Gene

Eine weitere Analyse sollte ausschließen, dass die ausgewählten Einzelsequenzen und potentiellen *cis*-Elemente aus Promotoren von Genen stammen, welche einer posttranskriptionellen Regulation unterliegen. Die Expression von sog. kleinen RNAs wie miRNA, siRNA und ta-siRNA sind die Grundlage für eine posttranskriptionelle Regulation (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). Eine vor kurzem erstellte Erweiterung der schon beschriebenen AthaMap DB ergibt die Möglichkeit potentiell posttranskriptionell regulierte Gene zu identifizieren (Bülow *et al.*, 2009). Für diese DB-Inhalte wurden Sequenzierungsdaten von kleinen RNAs (17mere) genutzt, welche im Keimling oder in Inffluoreszenzen vorkommen (Lu *et al.*, 2005). Übereinstimmungen mit diesen Sequenzen wurden im *Arabidopsis* Genom in den kodierenden Regionen von Genen gesucht. Der Screen fand mit 109.590 17meren statt und ergab 403.173 Treffer. Es wurden 5772 Gene identifiziert, welche in ihrem Transkript in *antisense* Orientierung eine solche Sequenz aufwiesen. Diese Gene liegen in der öffentlichen Form der AthaMap vor. Mit einfachen SQL-Anweisungen wurde in der AthaMap abgefragt, ob diese potentiell posttranskriptionell regulierten Gene mit einzelnen Genen oder einer Gensammlung (koreguliert) korrelieren. Für die Sets an koregulierten Genen (Anhang 8.7.) der Motive, aus denen die 17 experimentell zu analysierenden Einzelsequenzen stammen (Tabelle 11, Seite 119), wurden diese Analysen durchgeführt. Bei keinem der ausgewählten Einzelsequenzen aus den entsprechenden Promotoren, ergab sich für die dazugehörigen Gene eine potentielle Regulation durch kleine RNAs (Daten nicht gezeigt).

3.11. Vorkommen der 17 ausgewählten Einzelsequenzen der Motive im *Arabidopsis thaliana* Genom

Um die wissenschaftliche Frage zu klären, ob die ausgewählten Einzelsequenzen vermehrt in Promotoren auftreten, wurde nach dem Vorkommen der Kernsequenzen der 17 Einzelsequenzen im *Arabidopsis* Genom gescreent. Darüber hinaus können mit dieser Analyse auch weitere Gene identifiziert werden, die die detektierten Motive im *upstream* Bereich der codierenden Region aufweisen. Die identifizierten Sequenzen könnten funktionell sein, wenn die Existenz der Sequenzen vermehrt im intergenischen Bereich auftritt, als statistisch aufgrund der Basenzusammensetzung des Genoms erwartet wird. Mit Hilfe einer Datenbank (TFBSite, Claudia Galuschka, persönliche Mitteilung) wurde nach dem Vorkommen der 17 Einzelsequenzen ohne die Randsequenzen (Tabelle 12) im *Arabidopsis thaliana* Genom (TAIR6 Release) gescreent.

Tabelle 12: Die ausgewählten Einzelsequenzen (Bezeichnung Spalte 1) wurden mit den entsprechenden Sequenzen (Spalte 2) für die Analyse des Vorhandenseins im *Arabidopsis thaliana* Genom verwendet.

Einzelsequenz-Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
3C_M1_S1	CGGTTACGGTTA
12c_M1_S1	AGGCCCATTAGG
12EE_M1_S1	CCTGCCCTCTCCGT
12EE_M1_S2	CCAACCCTCTCCCT
12r_M1_S1	TCGTCTCTTC
15AAA_M1_S1	GACCTAAACCA
15CCC_M1_S1	CGTGTACTAGGTC
18H_M2_S1	AACGCAAAC
20a_M1_S1	GGCTCGAGTG
21S_M1_S1	TTACGAACC
22AAA_M1_S1	CTCGTCCCCATCCTC
24F_M1_S1	GTGACATAA
30A-8_M1_S1	ACGCCGGCGG
30I-8_M1_S1	GACTTTT
30I-8_M1_S2	AAAAGTC
37C_M1_S1	TTGGGCC
37E_M1_S1	AACCTGCGAAACCC

Mit dem Programm *find.pl* (Lorenz Bülow, persönliche Mitteilung) und den in Tabelle 12 aufgeführten Sequenzen wurden die genomischen Positionen der Sequenzen bestimmt. Außerdem berechnete das Programm das theoretische Vorhandensein einer Sequenz und das tatsächliche Vorhandensein einer Sequenz aufgrund der Basenverteilung der Sequenz und der Basenverteilung des Genoms.

Es wurde eine Ausgabedatei produziert, mit deren Hilfe in der DB TFBSite die Frage beantwortet werden konnte, wo im Genom die Sequenzen vorkamen. Um diese Frage zu beantworten, wurden zunächst jeweils die maximalen Längen der verschiedenen Genbereiche im TAIR6 Genomrelease identifiziert (Lorenz Bülow, persönliche Mitteilung). Diese betrugen für den intergenischen Bereich 72.791 Basen, bei der 5'-UTR 2331 Basen, für die codierende Region 15.195 Basen, für ein Intron 7384 Basen und für die 3'-UTR 3118 Basen.

Mit den erhaltenen Ausgabedateien des Programms *find.pl* konnte in der Datenbank TFBSite nach Übereinstimmungen im Genom gesucht werden. Auf DB-Ebene wurden die Übereinstimmungen für den intergenischen Bereich, die 5'UTR, die codierende Region (CDS), den Introns und die 3'UTR erhalten und das jeweilige nächstgelegene Gen ausgegeben. Diese Untersuchung wurde mit dem Programm *CGfactors Netti* durchgeführt (Claudia Galuschka, persönliche Mitteilung).

Die Ergebnisse für die Treffer im Genom der ausgewählten 17 Einzelsequenzen, das Vorhandensein in den jeweiligen Genbereichen und die statistische Verteilung ist in Tabelle 13 aufgezeigt.

Tabelle 13: Für die Einzelsequenzen sind die Treffer im Genom (intergenischer Bereich, 5'-UTR, Introns, CDS und 3'UTR) von *Arabidopsis thaliana* des TAIR6 Releases aufgelistet, sowie die statistische Erwartung und die tatsächliche Verteilung der Übereinstimmungen.

Einzelsequenz	Treffer theoretisch	Treffer tatsächlich	Faktor tatsächlich/theoretisch	Intergenischer Bereich	5'UTR	Intron	CDS	3'UTR
3C_M1_S1	8,7	90	10	78	0	5	7	0
12c_M1_S1	4,9	21	4	17	0	2	2	0
12EE_M1_S1	0,1	1	10	1	0	0	0	0
12EE_M1_S2	0,1	1	10	1	0	0	0	0
12r_M1_S1	151,2	549	4	147	55	40	289	18
15AAA_M1_S1	48,4	63	1	27	1	12	21	2
15CCC_M1_S1	1,6	1	1	1	0	0	0	0
18H_M2_S1	839,2	1226	1	483	34	204	450	55
20a_M1_S1	48	64	1	23	3	1	37	0
21S_M1_S1	839,2	531	1	274	5	59	174	19
22AAA_M1_S1	0	1	-	1	0	0	0	0
24F_M1_S1	1489,9	1105	1	615	12	202	234	42
30A-8_M1_S1	15,2	62	4	13	6	2	39	2
30I-8_M1_S1	25855,9	27257	1	14771	594	4762	6053	1077
30I-8_M1_S2	25855,9	27257	1	14771	594	4762	6053	1077
37C_M1_S1	4620,4	8862	2	6060	47	424	2127	204
37E_M1_S1	0,5	2	4	1	0	1	0	0

Eine geringe Trefferzahl der Sequenzen im Genom (Tabelle 13) wurde bei den langen Sequenzen (>13nt) erhalten (12EE_M1_S1, 12EE_M1_S2, 15CCC_M1_S1, 22AAA_M1_S1 und 37E_M1_S1).

Bei den Einzelsequenzen 12r_M1_S1, 20a_M1_S1 und 30A-8_M1_S1 wurden die meisten Treffer in codierenden Bereichen von Genen (CDS, Tabelle 13) detektiert. Dem gegenüber wurden bei allen anderen Sequenzen die meisten Sequenzübereinstimmungen in intergenischen Bereichen von Genen, unter anderem in Promotoren, aufgezeigt (Tabelle 13).

Auffällig war, dass die Einzelsequenz 3C_M1_S1 10mal mehr im intergenischen Bereich vorkommt, als theoretisch aufgrund der Basenzusammensetzung des Genoms zu erwarten war. Demzufolge könnte diese Sequenz eine regulatorische Funktion besitzen. Die 78 Übereinstimmungen (Tabelle 13) liegen im intergenischen Bereich von 34 Genen. Unbedeutend ist, dass auch die beiden Sequenzen 12EE_M1_S1 und 12EE_M1_S2 10mal mehr als erwartet auftreten, da es sich um sehr lange Sequenzen handelt. Die Einzelsequenzen 12c_M1_S1, 12r_M1_S1, 30A-8_M1_S1 und 37E_M1_S1 traten 4mal öfter als erwartet in intergenischen Bereichen auf, die Einzelsequenz 37C_M1_S1 doppelt so oft, als theoretisch erwartet (Tabelle 13).

Eine potentielle Funktion als *cis*-regulatorisches Element kann für das Motiv 3C_M1 aufgrund dieser Analyse postuliert werden, da die ausgewählte Kernsequenz deutlich vermehrt in intergenischen Bereichen auftritt, als statistisch zu erwarten gewesen wäre. Zu den 34 Genen, welche das Motiv 3C im intergenischen Bereich aufweisen, gehören unter anderem MYB TFen (At1g66390; At5g26660) und unbekannte exprimierte Proteine (At2g12170; At2g14910; At3g27180), welche ebenfalls TFen oder regulatorische Protein darstellen könnten.

3.12. Identifizierung von funktionellen Pathogen-responsiven *cis*-Elementen im heterologen System

Entscheidend für die Funktionalität der ausgewählten Einzelsequenzen ist eine PAMP-regulierte Reportergen-Expression, welche die Auslösung einer Pathogenantwort in einem geeigneten System simuliert. Zur Überprüfung der bioinformatisch vorausgesagten Pathogen-responsiven Einzelsequenzen wurde zur experimentellen Untersuchung ein transientes Petersilien-Protoplasten System verwendet (2.4.). Es wurde ein heterologes System gewählt, da dadurch die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Pflanzenspezies angenommen werden kann (Kirsch *et al.*, 2001). Als PAMP wurde Pep25 verwendet, ein Peptid, welches aus der Zellwand von *Phytophthora sojae* stammt. Das System wurde von Julia Niemeyer im Rahmen ihrer Doktorarbeit (persönliche Mitteilung) etabliert. Von 17 in dieser Arbeit ausgewählten Einzelsequenzen (Tabelle 11, Seite 119) zeigten experimentell die tetramerisierten Sequenzen 18H_M2_S1, 15AAA_M1_S1, 30I-8_M1_S2 eine Induktion durch Pep25 im transienten Petersilien-System (Abbildung 65). Die Datengrundlagen der Einzelexperimente sind im Anhang 8.5. aufgestellt. Die zusammen gefassten Ergebnisse (Anhang 8.5.) sind in Form eines Balkendiagramms dargestellt (Abbildung 65). Auf der x-Achse sind die einzelnen transformierten Konstrukte aufgelistet, auf der y-Achse ist die Expression des Reportergens in pmol 4-MU/(min*mg) aufgetragen. Als Negativkontrolle diente der pBT10-Vektor, der lediglich einen Minimalpromotor vor dem GUS-Reportergen aufwies (TATA-GUS). Als Positivkontrolle wurde das 2xS_2xD-Element verwendet (van de Löcht *et al.*, 1990). Die blauen Balken zeigen die Expressions-Werte, die ohne PAMP-Vorhandensein erhalten wurden, wohingegen die lila Balken die GUS-Werte nach 24h PAMP-Behandlung widerspiegeln.

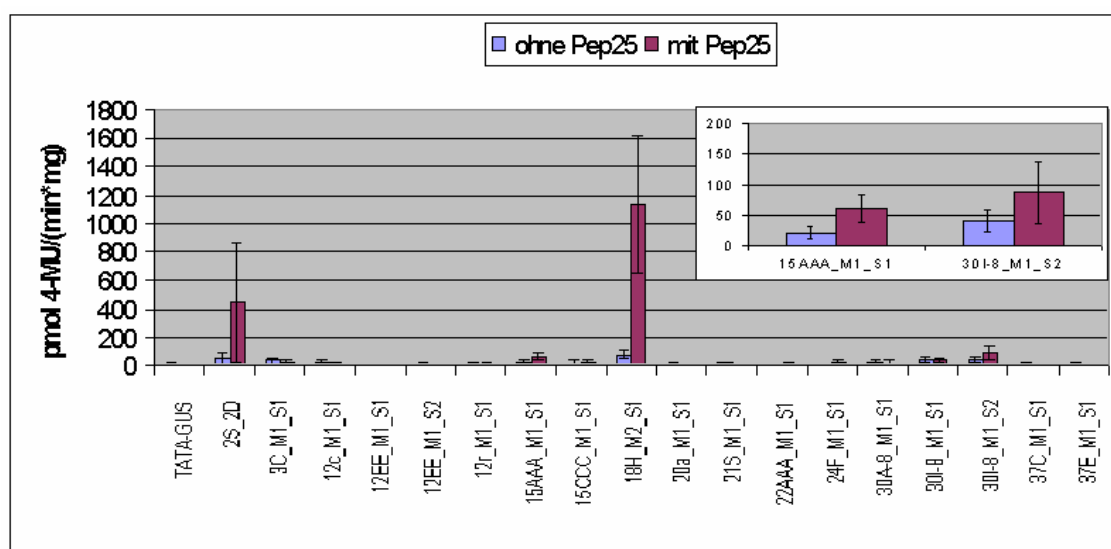


Abbildung 65: Balkendiagramm der Ergebnisse des transienten Petersilien-Protoplastenassays auf PAMP-Induzierbarkeit (Pep25) von 17 untersuchten potentiellen regulatorischen Sequenzen. Die Induzierbarkeit ist in pmol 4-MU/(min*mg) angegeben.

In Abbildung 65 zeigt das Kontrollkonstrukt 2xS_2xD wie erwartet eine Induktion nach 24 Stunden mit der PAMP-Behandlung Pep25. Darüber hinaus zeigen die Einzelsequenzen 18H_M2_S1, 15AAA_M1_S1 und 30I-8_M1_S2 eine Induktion verglichen mit dem Ansatz ohne Pep25. Die absoluten Werte von 15AAA_M1_S2 und 30I-8_M1_S2 waren sehr gering, deshalb wurden die Ergebnisse vergrößert in der Abbildung 65 dargestellt.

Eine weitere Analyse beschäftigte sich mit der Multimerisierung der Einzelsequenz 18H_M2_S1. Im Petersilien-Protoplasten System wurde die Induzierbarkeit eines Dimers, Tetramers und Oktamers von 18H_M2_S1 auf das PAMP Pep25 untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass die Einzelsequenz in Vierfachanordnung die stärkste Induktion relativ zum Ansatz ohne Pep25 aufzeigte (Ergebnisse nicht gezeigt).

Es handelt sich bei allen eben aufgeführten Daten um rein qualitative Ergebnisse. Aussagen über Expressionsstärken können erst unter Einsatz einer Transformationskontrolle getroffen werden.

3.13. Überprüfung von ausgewählten Einzelsequenzen im homologen System

Um die ausgewählten Einzelsequenzen in einem weiteren System auf ihre Induzierbarkeit zu überprüfen, wurde das *Arabidopsis*-Protoplasten System angewandt (2.5.). Es wurde eine Induktion der Einzelsequenzen durch das bakterielle PAMP Flg22, sowie die endogenen Elicitoren AtPep1 und AtPep2 untersucht. Außerdem wurde das bereits positiv getestete 18H_M2_S1-Konstrukt auf eine Responsivität von MJ und SA untersucht.

3.13.1. Induktion durch die PAMPs Flg22, AtPep1 und AtPep2

Im homologen *Arabidopsis*-Protoplasten System wurden alle Einzelsequenzen, welche im pBT10-Vektor vor einem GUS-Reportergen kloniert vorlagen, auf eine Responsivität des bakteriellen PAMPs Flg22, sowie der endogenen Peptid-Elicitoren AtPep1 und AtPep2 analysiert (Julia Niemeyer, persönliche Mitteilung).

Die Einzelsequenz 30I-8_M1_S1 und 30I-8_M1_S2 scheinen im *Arabidopsis* Protoplasten System durch das bakteriellen PAMP Flg22 induziert zu sein (Julia Niemeyer, Daten nicht gezeigt). Diese Einzelsequenzen, sowie 12r_M1_S1 zeigten ebenfalls eine Induktion auf die endogenen Elicitoren AtPep1 und AtPep2 (Julia Niemeyer, Daten nicht gezeigt).

3.13.2. Induktion der Einzelsequenz 18H_M2_S1 durch die Signalmoleküle MJ und SA

Die Einzelsequenz 18H_M2_S1 wurde im homologen *Arabidopsis*-Protoplasten System auf eine Induzierbarkeit der Signalmoleküle SA und MJ untersucht.

Bei dieser Einzelsequenz wurde kein reproduzierbares Ergebnis hinsichtlich einer Responsivität auf diese Signalmoleküle erhalten (Daten nicht gezeigt).

3.14. Durch Agroinfiltration identifizierte, funktionelle *cis*-Elemente

Um die Funktionalität der 17 Einzelsequenzen in einem weiteren heterologen System zu untersuchen, wurden alle 17 Sequenzen mittels der so genannten Agroinfiltration an *Nicotiana benthamiana* analysiert (Fabian Machens, 2008).

Mit diesem Experiment wurde zum einen die Funktionalität der Elemente *in planta* geprüft, zum anderen wurde in dem System ein lebender Organismus (*Agrobacterium tumefaciens*) eingesetzt, der die Reporter-gen-Expression auslösen könnte. Hierfür wurden die unter 2.6. beschriebenen Promotor-Reporter-gen-Konstrukte verwendet. 6 Konstrukte zeigten bei den Infiltrationsexperimenten eine reproduzierbare Reporter-gen-Expression. Dabei beruhen die Ergebnisse auf mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Die folgenden Ergebnisse (Abbildung 66) zeigen die positiven Ergebnisse anhand von repräsentativen Fotos der gefärbten Blätter. Wenn eine Blaufärbung an der mit dem Promotor-Reporter-gen-Konstrukt infiltrierten Position auftrat, egal welcher Intensität, wurde das Ergebnis als positiv gewertet. Es kam bei Wiederholungen des gleichen Experimentes teilweise zu starken Abweichungen hinsichtlich der Intensität der Blaufärbung. Aufgrund einer fehlenden internen Kontrolle können keine quantitativen Aussagen getroffen werden.

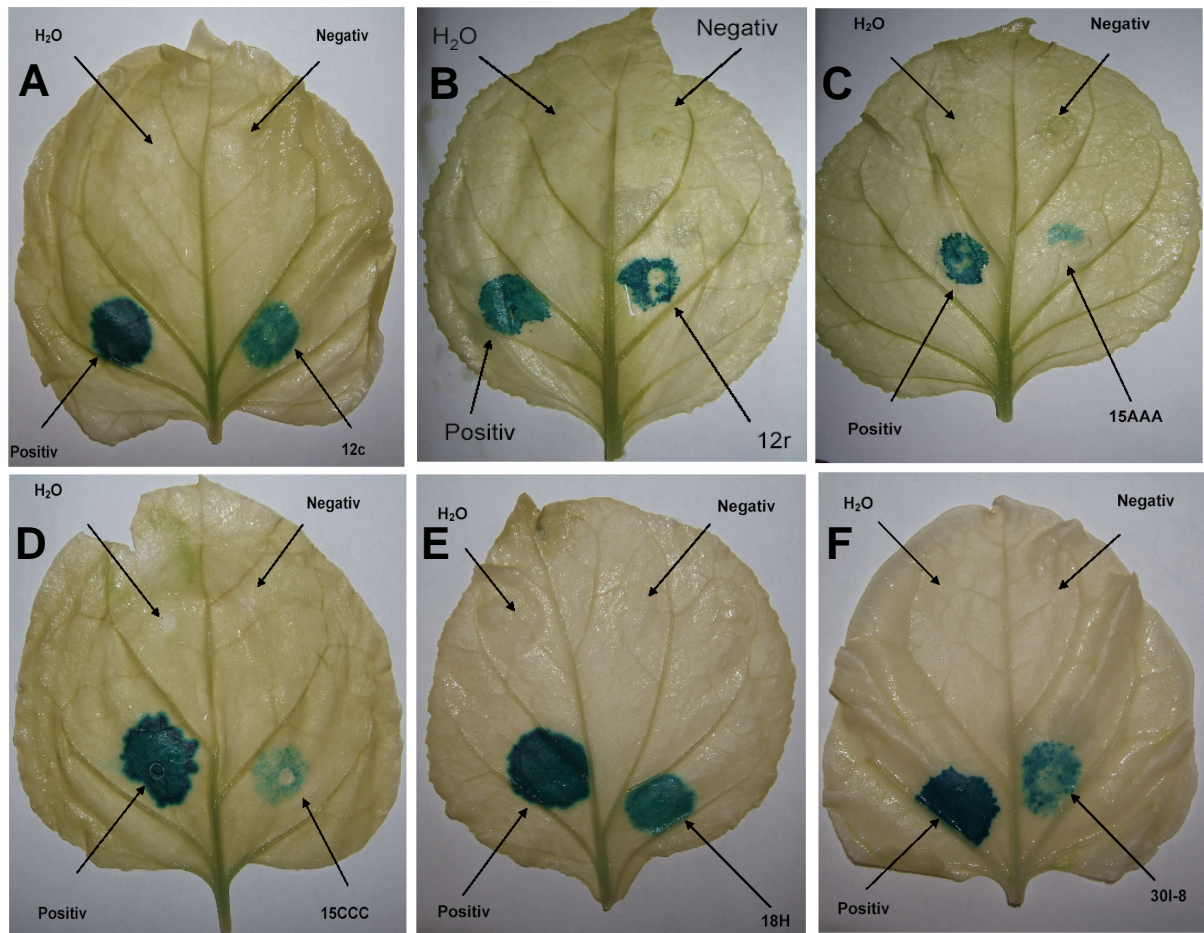


Abbildung 66: Zusammenfassung der Ergebnisse des Agroinfiltrationssystems. Alle 17 Einzelsequenzen wurden untersucht. Dargestellt sind nur die positiven Ergebnisse. Zu sehen sind Tabakblätter nach erfolgtem Infiltrationsassay und Herauswaschen der Blattfarbstoffe nach Ethanolbehandlung. Eine Blaufärbung zeigt die Expression des GUS-Reportergens an. Die Pfeile markieren die Orte, wo die Konstrukte infiltriert wurden. Oben links eines jeden Blattes ist eine Negativinfiltration mit Wasser zu sehen. Oben rechts wurde ein Konstrukt infiltriert, welches eine TATA-Box vor dem Reportergen enthielt. Unten links eine Positivkontrolle, ein 35S-GUS-Konstrukt. Unten rechts die unterschiedlichen Konstrukte, die ein positives Ergebnis hinsichtlich einer GUS-Färbung nach vier Tagen aufwiesen. Die positiv getesteten Konstrukte sind 12c_M1_S1 (A), 12r_M1_S1 (B), 15AAA_M1_S1 (C), 15CCC_M1_S1 (D), 18H_M2_S1 (E) und 30I-8_M1_S1 (F).

Die Einzelsequenz des Motivs 12c_M1 zeigte nach 4 Tagen Inkubation (4dpi) eine deutliche Reportergen-Expression (Abbildung 66, A). Die Kontrolle H₂O (Wasser), bei der nur Wasser infiltriert wurde, sowie die Negativkontrolle, welche eine TATA-Box vor dem Reportergen darstellt, zeigten keine Expression. An der Stelle, die mit dem 12c-Konstrukt infiltriert wurde, ist eine sichtbare Blaufärbung aufgetreten. Das mit dem Konstrukt 12r_M1_S1 infiltrierten Blatt zeigte vier Tage nach der Infiltration (4dpi) eine deutliche

Blaufärbung an der Stelle, wo das Konstrukt eingebracht wurde (Abbildung 66, B). Teil C der Abbildung 66 zeigt das Infiltrationsergebnis für die Sequenz des Motivs 15AAA_M1. Nach vier Tagen Inkubation zeigte sich eine Reporterexpression. Ein Ergebnis hinsichtlich der Expression zeigte sich bei der Sequenz des Motivs 15CCC_M1 nur sehr schwach nach vier Tagen Inkubation (Abbildung 66, D). Eine deutliche GUS-Expression wurde nach vier Tagen nach der Infiltration der Sequenz des Motivs 18H_M2 an der Stelle nachgewiesen, welche infiziert wurde (Abbildung 66, E). Für das Konstrukt 30I-8_M1_S1 zeigte sich nach vier Tagen Inkubation eine GUS-Expression (Abbildung 66, F). Alle übrigen untersuchten Konstrukte zeigten keine Reporterexpressionen. Diese Einzelsequenzen waren dementsprechend im Agrobakteriensystem nicht funktionell. Ob die positiv getesteten Elemente tatsächlich durch eine Agrobakterieninfektion eine Funktionalität zeigten, kann ohne interne Kontrolle (ohne Agrobakterieninfektion) nicht eindeutig festgestellt werden.

3.15. Experimentelle Untersuchung von Effekten, die durch Kombination der Einzelsequenz 18H_M2_S1 mit dem D-Element entstehen können

Um die Verstärkung bzw. Spezifität der Einzelsequenz 18H_M2_S1 weiter zu untersuchen, wurde diese bereits als Pep25-induzierbar identifizierte Sequenz mit dem aus der Literatur bekannten D-Element (Rushton *et al.*, 2002) kombiniert und in Petersilien-Protoplasten auf Pep25 Induzierbarkeit überprüft. Das D-Element ist ebenfalls durch Pep25 induzierbar und lag in zweifacher (2x) bzw. vierfacher (4x) Kopie im pBT10-Vektor vor einem Luziferase (LUC) Reporter gen vor (2.1.9.). Die Einzelsequenz 18H_M2_S1 ist in zweifacher (2x) bzw. vierfacher (4x) Kopie im pBT10-Vektor vor einem Luziferase (LUC) Reporter gen vorhanden (2.1.9.) und wird in Folge als 2x18H bzw. 4x18H bezeichnet. Im transienten Petersilien-Protoplasten System wurde als Negativkontrolle ein pBT10-Vektor mit Minimalpromotor vor dem LUC-Reporter gen verwendet (TATA-LUC). Als Positivkontrolle wurde das 2xS_2xD-Konstrukt eingesetzt, ebenfalls mit dahinter geschaltetem LUC-Reporter gen.

Die zu untersuchenden Konstrukte enthielten jeweils vor dem Reportergen das 2x18H_2xD-Element oder das 4x18H_2xD-Element. Alle Plasmide wurden als Klone von der KWS-Saat AG (Dietmar Stahl, persönliche Mitteilung) zur Verfügung gestellt und im Petersiliensystem auf eine Induktion durch das PAMP Pep25 analysiert.

Die gemessenen relativen Luziferaseinheiten (RLU) wurden pro mg eingesetztes Protein berechnet und grafisch als Balkendiagramme dargestellt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 67 und Abbildung 68 dargestellt und resultieren aus drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse ohne Pep25 sind als blaue Balken dargestellt, die Werte für die Ansätze mit Pep25 werden in Form von lila Balken dargestellt.

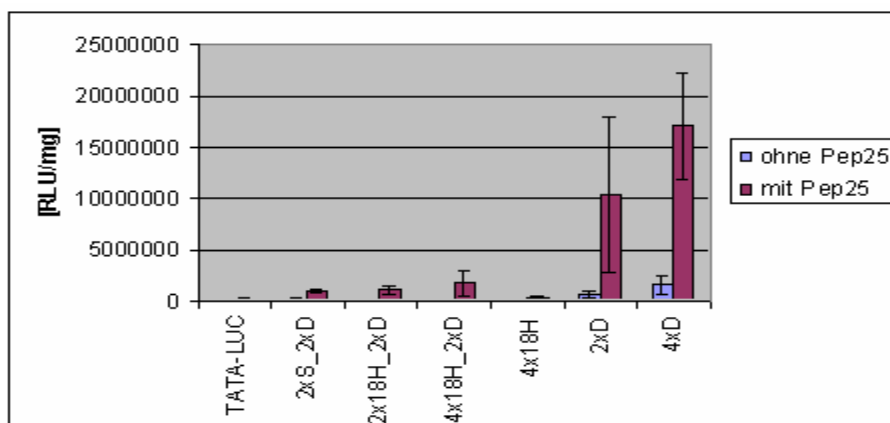


Abbildung 67: Ergebnisse der Zusammenfassung dreier Einzelexperimente.

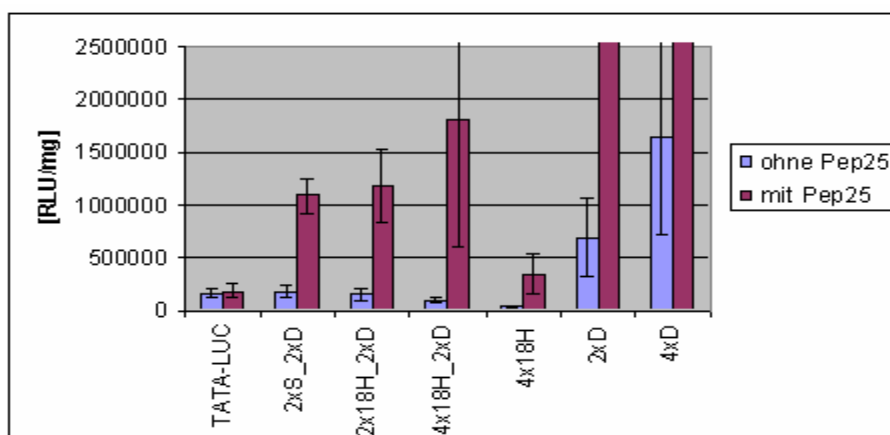


Abbildung 68: Ergebnisse der Zusammenfassung der drei Einzelexperimente aus Abb. 67 mit veränderter y-Achsenkalierung.

Das 2xD- und das 4xD-Element zeigten sehr hohe Induktionen im Vergleich zu den übrigen untersuchten Konstrukten (Abbildung 67). Jedoch zeigten auch die Ansätze ohne PAMP (blau) von 2xD und 4xD bereits sehr hohe RLU-Werte (Grundaktivität) bezogen auf das vorhandene Gesamtenzym. Ein absoluter Vergleich der Induzierbarkeit der Konstrukte untereinander ist nicht möglich, da kein Referenzplasmid kotransformiert wurde, um einen Bezug zur Transformationseffizienz mit den jeweiligen RLUs herstellen zu können.

Um die Ergebnisse besser bewerten zu können, wurden die maximal angezeigten Werte auf der y-Achse um den Faktor 10 herabgesetzt (Abbildung 68). Die Konstrukte 2xS_2xD, 2x18H_2xD, 4x18H_2xD und 4x18H zeigten eine deutliche Induktion durch den verwendeten PAMP (mit Pep25) im Vergleich zu den jeweiligen Ansätzen in denen kein PAMP (ohne Pep25) vorlag. Hier zeigte sich, dass die Konstrukte 2xS_2xD, 2x18H_2xD und 4x18H_2xD vergleichbar hohe LUC-Expressionswerte aufwiesen. Bei Kombination des 2xD-Elementes mit dem 2x18H- bzw. 4x18H-Element zeigte sich zudem eine deutliche Reprimierung der Grundaktivität in den Ansätzen ohne Pep25. Wichtig ist, diese Ergebnisse unter Verwendung einer Transformationskontrolle zu reproduzieren.

4. Diskussion

4.1. Bioinformatische Voraussage von Pathogen-responsiven *cis*-Elementen

Die Affymetrix Genchiptechnologie ermöglicht eine Analyse von ca. 2/3 aller *Arabidopsis* Gene mit über 22.000 Array-Elementen (Redman *et al.*, 2004). 21.159 nachzuweisende Gene sind auf dem ATH1-Chip als Einzelgene (keine Genfamilien) vorhanden, das entspricht 67% des TAIR6-Genomreleases. Kennzeichnend für die Affymetrix Genchiptechnologie ist eine hohe Reproduzierbarkeit der einzelnen Arrays (Henning *et al.*, 2003). Diese Hochdurchsatztechnologie für die Analyse transkriptioneller Profile erweitert das Spektrum an biologischen Daten und ermöglicht neue Wege der Identifizierung von Grundlagenwissen (Holloway *et al.*, 2002). Es gibt verschiedene Techniken zur Detektion von vorhandenen Transkripten einer Teilmenge oder aller Gene eines Organismus: Dazu zählen cDNA und Oligonukleotidarrays (Southern *et al.*, 1992; Schena *et al.*, 1995), serielle Analysen der Genexpression (*serial analysis of gene expression*=SAGE; Velculescu *et al.*, 1995), massives paralleles Signatur-Sequenzieren von amplifizierter cDNA an Säulen (*massively parallel signature sequencing of attached amplified cDNA ti microbounds*=MPSS; Brenner *et al.*, 2000), sowie verschiedene Gel-basierte Technologien, die der Identifizierung von differentiell exprimierten Genen dienen (Liang und Pardee, 1992; Breyne und Zabeau, 2001).

Eine Transkriptomanalyse bei Pflanzen, die mit einem Pathogen infiziert wurden, kann Hinweise auf vorhandene Signalwege liefern. Durch die Annotation und die große Menge öffentlich zugänglicher Microarrays ist eine breite Datenbasis für die Identifizierung von koregulierten Genen vorhanden, welche unter verschiedenen Bedingungen hochreguliert bzw. induziert sind. So zeigte Schenk *et al.* (2006), dass es bei den Transkriptomen von SA-, MJ- und Ethylen-behandelten Pflanzen Sets an koregulierten Genen gibt, welche induziert sind. Die Zusammenstellung der Stimuli bei einer Abfrage kann sowohl Wirt- als auch Nicht-Wirt-Pathogen, Signalmoleküle, die eine biotrophe oder nekrotrophe Resistenz vermitteln, als auch PAMPs betreffen. Die Vielfalt an möglichen Stimuli ermöglicht die Identifizierung von spezifischen

potentiellen Regulatoren (ein Stimulus, bzw. nur biotrophe Resistenz), als auch unspezifische, generelle *cis*-Elemente (mehrere Stimuli, biotrophe und nekrotrophe Resistenz, Wirt und Nicht-Wirt). Gene, die durch verschiedene externe Stimuli (Multi-Stimuli) differentiell exprimiert werden, besitzen vermutlich dicht gepackte *cis*-regulatorische Elemente in ihren Promotoren, im Gegensatz zu Einzel-Stimuli regulierten Genen (Walther *et al.*, 2007).

Es gibt verschiedene Methoden, um potentielle *cis*-Elemente, welche eine transkriptionelle Regulation auslösen könnten, vorherzusagen. Zum Beispiel besteht die Möglichkeit in Promotoren von koregulierten Genen (welche experimentell identifiziert wurden) nach Anhäufungen von bekannten *cis*-Elementen zu suchen (AthaMap Datenbank; Galuschka *et al.*, 2007). Über die Art der vermehrt vorkommenden TFen kann eine Aussage über potentielle Signalwege und eine vorliegende Regulation getroffen werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Identifizierung von Oligomeren, welche mit einer bestimmten Genexpression korrelieren (ATTEDII Datenbank; Obayashi *et al.*, 2009). Eine dritte Möglichkeit, welche zudem als einzige die Bereitstellung von neuen, unbekannten *cis*-Elementen ermöglicht, ist die Detektion von konservierten Sequenzmotiven in koregulierten Genen. Es gibt viele Programme, welche konservierte Sequenzmotive detektieren können, z. B. MEME (Bailey und Elkan, 1994), BioProspector (Liu *et al.*, 2001a), Consensus (Hertz und Stormo, 1999), AlignACE (Roth *et al.*, 1998), Co-Bind (Guha und Stormo, 2001) oder MITRA (Eskin und Pevzner, 2002). Das Softwareprogramm BEST (Che *et al.*, 2005) vereint erstmals vier Programme mit unterschiedlichen Algorithmen, vergleicht objektiv mithilfe des BioOptimizers (Jensen und Liu, 2004) die verschiedenen vorhergesagten Motive und gibt das optimale Ergebnis aus.

Es war bereits bekannt, dass sich in Promotoren von Pathogen-Abwehrgenen bestimmte *cis*-Elemente befinden, die der Pflanze eine Resistenz vermitteln. Im Falle der W-Box binden WRKY-Faktoren an diese *cis*-Elemente und bestimmen eine regulierte Pathogenabwehr (Rushton *et al.*, 1996). Die W-Box wird als weit verbreitetes Element in Promotoren von Genen identifiziert, welche einen Pathogenbezug haben (Ramonell *et al.*, 2002; Eulgem *et al.*, 2004). Auch GCC-verwandte Motive sind oft in Promotorregionen von Pathogen-Abwehrgenen vorhanden (Ohme-Takagi und Shinshi, 1995).

Mit Hilfe der in dieser Arbeit erstellten Datenbank und der anschließenden Promotoranalyse wurden 407 Motive detektiert (3.2.), welche in 37 Gruppen klassifiziert wurden (3.4.). Das Auftreten von *cis*-Elementen, welche der W-Box ähneln (Motivgruppe 27, Seite 105, Abbildung 47) oder GCC-verwandte Motive (Motivgruppe 24, Seite 103, Abbildung 44) innerhalb der Analyse zeigt, dass sich die Methode der bioinformatischen Analyse von Microarraydaten und anschließender Detektion von konservierten Sequenzmotiven eignet, regulatorische Pathogen-responsive *cis*-Elemente zu identifizieren. Eulgem (2005) postuliert, dass noch kein Element in Promotoren mit Pathogenbezug gefunden wurde, welches so präsent wie die W-Box ist. Zudem vermutet aber auch er, dass es weitere, neue *cis*-Elemente in den Promotoren von Pathogen-responsiven Genen geben könnte. Dem kann zum einen in dieser Arbeit widersprochen werden, da nicht die Gruppe mit den W-Boxen (Gruppe 27, 26 Mitglieder) die Gruppe mit den meisten Familienmitgliedern war, sondern die Motivgruppe 1 mit der G-Box (76 Mitglieder). Abhängig ist das Vorkommen von *cis*-Elementen jedoch von den abgefragten Stimuli und den zugrunde liegenden Daten. Diese Arbeit zeigt, dass weitere, unbekannte *cis*-Elemente in Promotoren Pathogen-responsiver Gene in großer Fülle vorkommen.

Ein Transkriptionsfaktor (*trans*-Faktor) bindet sequenzspezifisch an einen DNA-Abschnitt. Er kann als Aktivator oder Repressor auf die Transkription einwirken (Karin, 1990). Es gibt generelle Transkriptionsfaktoren, wie das TBP, welches für die Initiation der Transkription notwendig ist (Roeder, 1996). Zudem gibt es spezielle Transkriptionsfaktoren, welche es der Pflanze ermöglichen selektiv auf z. B. bestimmte abiotische oder biotische Stresse mit einer veränderten Genexpression zu reagieren. Dabei werden nur bestimmte Gene abgelesen. Ein Transkriptionsfaktor enthält verschiedene Domänen. Zunächst eine oder mehrere DNA-Bindungsdomäne(n), transaktivierende Domänen, an die auch Ko-Aktivatoren binden können und in einigen Fällen eine Ligandenbindungsstelle (Latchman *et al.*, 1997). Transkriptionsfaktoren werden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten und der Tertiärstruktur der DNA-Bindungsdomäne in Familien unterteilt (Stegmaier *et al.* 2004; Matys *et al.*, 2006).

In *Arabidopsis* wurden die TFen bei Riaño-Pachón *et al.* (2007) in 68 Familien eingeteilt. Die Anzahl der TF-Familien und der im *Arabidopsis* Genom vorhandenen TFen kodierender Gene variiert in verschiedenen Publikationen. Bei Riaño-Pachón *et al.* (2007) sind es 2147 einzigartige Proteinsequenzen (TAIR6 Genomversion). Dabei wurden die TFen nach ihrer Domänenarchitektur identifiziert und in Familien gruppiert. Die größten Klassen an TF-Familien stellen in *Arabidopsis* die AP2/EREB, bHLH, bZIP, Zinkfinger (C2H2), HB, MADS, MYB und NAC Transkriptionsfaktoren (Qu und Zhu, 2006).

Für eine wichtige regulatorische Rolle von TFen in der Pflanze spricht auch die Tatsache, dass in *Arabidopsis* ca. 7% aller Proteine Transkriptionsfaktoren sind (Riaño-Pachón *et al.*, 2007). Je nachdem welche bioinformatischen Strategien zur Identifizierung von TFen genutzt werden, variiert die Zahl der Gene, die für TFen kodieren (Davuluri *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2005; Iida *et al.*, 2005; Riechmann *et al.*, 2005). Mit ca. 5-10% an Transkriptionsfaktorgenen im gesamten Genom besitzt *Arabidopsis* deutlich mehr TF-Gene als *D. melanogaster* (4.7%) und *C. elegans* (3.6%) (Riechmann *et al.*, 2000). Dieser Prozentsatz ist vergleichbar mit dem des Menschen (6%; Venter *et al.*, 2001). Nicht nur die Anzahl der TF-Gene ist bei Pflanzen relativ hoch, besonders ist auch die große Diversität an Bindungsspezifitäten der einzelnen TF-Familien (Ohme-Takagi, 2009). Das spricht für eine wichtige Rolle der TFen in der Regulation der Pflanze.

Es gibt wenige Transkriptionsfaktorfamilien, für die bereits viele Transkriptionsfaktoren charakterisiert sind (Qu und Zhu, 2006). Viele TFen formen großen Familien, deren Mitglieder sehr ähnliche Bindungssequenzen aufweisen. Zum Beispiel liegen der NAC- und AP2/ERF-Familie mehr als 100 Gene zugrunde (Ohme-Takagi, 2009). Weiter gibt es nur wenige TF-Familien, bei denen die exakten Bindungsstellen bekannt sind. Nur 10% der in *Arabidopsis* identifizierten TFen sind molekularbiologisch charakterisiert worden (Qu und Zhu, 2006). Die mit *expressed protein* bezeichneten Gene im Genom von *Arabidopsis* könnten auch unbekannte TFen darstellen. Das heißt, dass unter den in dieser Arbeit detektierten potentiellen *cis*-Elementen mit einem bislang nicht beschriebenen Pathogenbezug auch potentielle Bindungsstellen für bislang unbekannte TFen vorliegen könnten.

Die Abbildung 58 (Seite 111) zeigt eine Übersicht der TF-Familien im erstellten STAMP-Baum aller 407 Motive, welche mit großer Wahrscheinlichkeit aufgrund der Alignments der Familienprofile und der ermittelten E-values eine Bindungssequenz der aufgezeigten TF-Familien enthalten. Demnach wurden zum einen potentielle Bindungsstellen von TFen detektiert, die aus TF-Familien mit vielen Mitgliedern stammen (MYB, AP2/ERF), aber auch aus Familien mit wenigen Mitgliedern (Proteine mit TCP-Domäne)(Riechmann *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurden potentielle *cis*-Elemente detektiert, an welche bZIP-Faktoren, WRKY-Faktoren oder E2F-Faktoren binden können. Vor allem die ERF und WRKY TFen sind dafür bekannt, in der Pathogenantwort eine Rolle zu spielen (Singh *et al.*, 2002).

Im Folgenden werden die Familienprofile ausgewählter Gruppen oder zusammengefasster Gruppen diskutiert. Dabei stehen folgende Argumentationspunkte im Vordergrund:

- Wie wahrscheinlich sind die dargestellten Homologien zu *cis*-Elementen bzw. TF-Bindungssequenzen?
- Kann eine TF-Familie abgeleitet werden?
- Bestehen ein Pathogenbezug oder andere Induktionsabhängigkeiten, die in der Literatur bekannt sind?

4.1.1. Motivgruppe 1 charakterisiert das *cis*-Element G-Box

Das Familienprofil der Motivgruppe 1 mit 76 Mitgliedern (Abbildung 21, Seite 91) entspricht eindeutig der G-Box (5'...CACGTG...3'), welche in zahlreichen Pflanzengenpromotoren, wie z.B. der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase (RuBisCO) identifiziert wurde (Giuliano *et al.*, 1988). Diese G-Box ist seit über 10 Jahren bekannt. Schon früh wurde die *in-vitro* Bindungsfähigkeit eines G-Box Faktors (GBF) an dieses Element gezeigt (Menkens *et al.*, 1995). Der Zusammenhang der G-Box in der Regulation von Genexpression bei Anaerobiose, Pflanzenentwicklung, Licht, ABA oder MJ wurde transient und in transgenen Pflanzen gezeigt (de Vetten und Ferl, 1995; Baum *et al.*, 1999; Weisshaar *et al.*, 1991; Reinbothe *et al.*, 1994).

Zwei Familien von TFen können die G-Box spezifisch binden: bZIP und bHLH (Katagiri und Chua, 1992), wobei letztere nicht nur die G-Box, sondern eine 5'...CANNTG...3' Consensus-Sequenz (E-Box) bindet. Es gibt palindromische und nicht-palindromische G-Boxen, welche zudem auch unterschiedliche Bindungseigenschaften aufweisen (Armstrong *et al.*, 1992). Im *Arabidopsis* Genom gibt es 75 Mitglieder von bZIP-Faktoren (Jakoby *et al.*, 2002) und damit vier Mal so viele wie in der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), dem Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) oder dem Menschen (*Homo sapiens*) (Riechmann *et al.*, 2000). Nach Klassifizierung der Domänen bilden Jakoby *et al.* (2002) in *Arabidopsis* 10 Untergruppen von bZIP-Faktoren. Diese TFen besitzen eine basische Region, welche die DNA bindet und ein Leuzin-Zipper-Dimerisierungsmotiv. Jakoby *et al.* (2002) postulieren weiter, dass die Familienmitglieder aufgrund der ähnlichen basischen DNA-Bindungsdomänen an ähnliche *cis*-Elemente binden. Diese TFen besitzen eine regulatorische Rolle bei Antworten auf biotische (Pathogene) sowie abiotische Stresse (z. B. Licht), als auch in Entwicklungsprozessen. Der GBF1 aus *Arabidopsis* gehört laut Jakoby zur Gruppe G von bZip-Faktoren und bindet an die ACGT Kernsequenz eines *cis*-Elementes (Foster *et al.*, 1994). *In vitro* Analysen zeigten, dass GBF-Proteine als Homo- oder Heterodimere an symmetrische oder asymmetrische G-Boxen in *Arabidopsis* binden (Schindler *et al.*, 1992). Zudem weist diese Gruppe eine Prolin-reiche N-terminale Aktivierungsdomäne auf.

Zusammenfassend steht die Motivgruppe 1 für eine G-Box verwandte Klasse an *cis*-Elementen, welche höchstwahrscheinlich von bZIP-Faktoren erkannt werden und vermutlich aktivierend in die Genexpression involviert sind. Zudem ist es die größte Gruppe mit 76 Mitgliedern. Dieses Element wurde demnach als am meisten präsenten Motiv in dieser Arbeit detektiert. Eventuell vermittelt die G-Box eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr.

Es könnten multivariante Regulationen über verschiedenen bZIP-Faktoren ermöglicht werden, da diese TF-Familie sehr viele verschiedene Familienmitglieder beinhaltet (Jakoby *et al.*, 2002). Unterschiedliche bZIP-Faktoren könnten auf unterschiedliche Stresse/Stimuli eine Antwort in der Pflanze hervorrufen (Jakoby *et al.*, 2002).

Werden die abgefragten Einzel-Stimuli der zugrunde liegenden Abfragen dieser Motivgruppe berücksichtigt, so zeigt sich, dass die Signalmoleküle MJ (34G-1, 34G-2, 34G-3) und SA (32D) vorkommen (Anhang 8.7.). Bei sehr vielen Abfragen dieser Gruppe spielen diese beiden Signalmoleküle eine Rolle (Anhang 8.7.). Die Signalmoleküle MJ und SA würden auf eine Involvierung der identifizierten *cis*-Elemente bei einer Pathogenantwort auf nekrotrophe sowie biotrophe Pilzen hinweisen. Dafür spricht auch, dass die parasitären Pilze *B. cinerea* (12MMM) und *P. infestans* (20A) jeweils im Einzelstimulus ein Motiv in dieser Gruppe hervorbringen (Anhang 8.7.). Nur gering konserviert zeigt sich die klassische G-Box als identifiziertes Motiv (Anhang Digital D auf CD-ROM) bei dem Einzelstimulus *E. orontii* (29PP).

4.1.2. Motivgruppen 2 und 3 besitzen Homologien zu ABA *response elements* (ABREs)

Die Motivgruppen 2 (2 Mitglieder) und 3 (3 Mitglieder) zeigen in den Sequenzlogos der Familienprofile (Abbildung 22, Seite 92 und Abbildung 23, Seite 92) Ähnlichkeiten zu Bindungssequenzen von ABREs (ABA *response elements*). ABA ist in abiotischen Stress als Signalmolekül involviert und wird laut neuester Studien als Kontrollpunkt zwischen abiotischer und biotischer Stressantwort vermutet (Robert-Seillantz *et al.*, 2007). ABREs kontrollieren die ABA- und/oder Stress-responsive Genexpression (Giraudat *et al.*, 1994). Ubiquitär bei diesem *cis*-Element ist eine 5'...(C/T)ACGTGGC...3' Consensussequenz und viele dieser Elemente enthalten eine 5'...CACGTG...3' (G-Box) Kernsequenz (Giuliano *et al.*, 1988). Deshalb gruppieren diese Motive auch so nah an der Motivgruppe 1. Bekannt ist, dass bZIP-Faktoren *in vitro* an ABREs binden (Foster *et al.*, 1994). Bei Jakoby *et al.* (2002) werden diese bZIP-Faktoren der Untergruppe A zugeordnet. ABRE Bindungsfaktoren (ABFs) oder Bindungsproteine von ABA-responsiven Elementen (AREB) können *in vitro* an Promotoren binden, welche ABRE enthalten (Choi *et al.*, 2000). In *Arabidopsis* wurden 4 ABFs (ABF1-4) über einen *Yeast-one-Hybrid Screen* isoliert (Choi *et al.*, 2000). Die Autoren um Kang *et al.* (2002) vermuten, dass zumindest ABF3 und ABF4 ein Stress-responsives ABA-Signalling vermitteln. ABF3 und ABF4 wurden bei Uno *et al.*

(2000) mit AREB1 und AREB2 bezeichnet, welche an ABA-responsive Promotorelemente in Protoplastenassays binden.

Diese in den Motivgruppen 2 und 3 identifizierten Motive und die dazugehörigen TFen könnten einen *cross-talk* zwischen abiotischen und biotischen Stress vermitteln. Nachzuweisen wäre, dass die potentiellen *cis*-Elemente sowohl ABA-responsiv als auch Pathogen-responsiv sind. Wie bei Robert-Seillantz *et al.* (2007) schon angemerkt, gibt es vermutlich ein Zusammenspiel aller Phytohormone in Bezug auf die Pathogenantwort und nicht nur die charakterisierten Signalmoleküle SA, MJ und Ethylen. Neuste Studien zeigen, dass ABA eine Rolle bei biotropher bzw. nekrotropher Resistenz auf Basis des *cross-talks* zwischen SA- und MJ-Signalweg spielen könnte (Ton *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2009).

4.1.3. Motivgruppe 5 charakterisiert *cis*-Elemente mit einer TGA-Bindungssequenz

Das Familienprofil der Motivgruppe 5 (7 Mitglieder) zeigt Ähnlichkeit zu Bindungsstellen von TGA1 (Abbildung 25, Seite 93). TGA Transkriptionsfaktoren sind Regulatoren von PR-Genen und gehören ebenfalls zur bZIP-Familie von TFen (Kesarwani *et al.*, 2007). Bei Jakoby *et al.* (2002) fallen sie in die Untergruppe D. Die Induktion der SAR korreliert mit der Expression von PR-Genen (Durrant und Dong, 2004). Außerdem steht die SAR mit einer Erhöhung der SA-Konzentration in der Pflanze in Verbindung (Gaffney *et al.*, 1993). Die SA-vermittelte Genexpression und die darin einbegriffene Resistenz erfordert die Funktion des NPR1-Proteins (Shah *et al.*, 1997). Dieses Protein verfügt über mehrere Domänen, die es zu Protein-Protein-Interaktionen befähigen (Cao *et al.*, 1997; Aravind und Koonin, 1999). Es wird vermutet, dass NPR1 bei der Regulation der PR-Genexpression als Kofaktor der TGAs fungiert (Fan und Dong, 2002). Zehn TGA TFen sind in *Arabidopsis* bekannt (Jakoby *et al.*, 2002), von denen sieben (TGA1-7) mit NPR1 zu interagieren zu scheinen. Diese sieben TGAs werden in drei Untergruppen eingeteilt, wobei TGA1 mit TGA4 zu der ersten Untergruppe gehört. Després *et al.* (2003) fanden heraus, dass zwei Cysteine in den TFen für die SA-vermittelte Interaktion mit NPR1 verantwortlich sind.

Eine Ähnlichkeit dieser Motivgruppe zu einer Bindungssequenz von TGA1 zeigt einen Zusammenhang dieser *cis*-Elemente für eine Resistenzvermittlung in der gesamten Pflanze (SAR). Eine Identifizierung der dazugehörigen TFen könnte einen Abgleich mit den aus *Arabidopsis* identifizierten TGA TFen nach sich ziehen und weitere Aufschlüsse vermitteln. Die detektierten Motive 20p_M1, 26p_M1 und 20u_M1 stammen aus Abfragen, die SA als Stimulus enthielten (Anhang 8.7.), wobei der Zusammenhang zur SAR gegeben wäre. Andererseits stammen die übrigen Motive (27G-5_M1, 27H-5_M1, 27C-4_M1 und 28M-1_M1) aus Abfragen, von denen in allen Fällen das Signalmolekül MJ vorhanden war (Anhang 8.7.). Dies würde gegen eine SA-vermittelte SAR der identifizierten *cis*-Elemente sprechen, da MJ ein Gegenspieler des Signalmoleküls SA darstellt. Alle Einzelmotive dieser Motivgruppe, bis auf 27C-4_M1 und 28M-1_M1, weisen ein 5'...TGACG...3'-Kernmotiv auf (Anhang Digital D auf CD-ROM). Ein Pathogenbezug über die Homologie zur TGA-BS liegt demnach vor, jedoch bleibt der Zusammenhang zu den zugrunde liegenden Stimuli unklar.

4.1.4. Die *cis*-Elemente der Motivgruppe 7 zeigen eine Homologie zur C-Box aus *Glycine max*

Das Sequenzlogo des Familienprofils der Gruppe 7 (8 Mitglieder) zeigt eine hohe Homologie zur palindromische Box C aus der Sojabohne (*Glycine max*) (Abbildung 27, Seite 94). Die bZIP-Faktoren STGA1 und STFs (STF1 und STF2) binden an diese Sequenz und wurden im apikalen Hypocotyl von Sojabohnenpflanzen detektiert (Cheong *et al.*, 1998). STF1 besitzt ein RING-Finger-Motiv und eine bZIP-Domäne. Es wird vermutet, dass STF1 als TF eine Funktion bei der Hypocotylelongation aufweist (Cheong *et al.*, 1998).

Die DNA-Bindungseigenschaften von STF1 und HY5 (*Long Hypocotyl5*, *Arabidopsis*) sind gleich. Beide erkennen eine Consensussequenz 5'...(G/A)(G/A)TGACGT(C/G/A)(A/T/G)...3' (Song *et al.*, 2008). Es ist eine längere Sequenz als diejenige, die von GBF TFen (4.1.1.) oder TGA TFen (4.1.3.) erkannt wird. HY5 ist ein bZIP TF, der eine Rolle bei Photomorphogenese und Hormonsignalling besitzen soll (Cluis *et al.*, 2004).

Die *cis*-Elemente dieser Motivgruppe werden vermutlich ebenfalls von bZIP TFen gebunden. Ein direkter Pathogenbezug der regulatorischen Elemente kann nach Abgleich der Homologiedaten und der Literatur nicht nachgewiesen werden.

4.1.5. Die Motivgruppen 6, 9 und 17 besitzen sehr geringe Homologien zu Bindestellen der bZIP-Faktoren 910 und 911 aus *Antirrhinum majus*

Die Sequenzlogos der Familienprofile der Gruppe 6 (4 Mitglieder, Abbildung 26, Seite 94), der Gruppe 9 (5 Mitglieder, Abbildung 29, Seite 95) und der Motivgruppe 17 (3 Mitglieder, Abbildung 37, Seite 99) zeigen sehr geringe Ähnlichkeiten zu Bindestellen von bZIP TFen aus dem großen Löwenmaul (*Antirrhinum majus*) (Martínez-García *et al.*, 1998). Die potentiellen *cis*-Elemente zeigen eine Ähnlichkeit zu einem C-Box/G-Box-Hybrid, an welches die TFen 910 und 911 binden (Martínez-García *et al.*, 1998). Diese kleinen Proteine gehören zu einer Untergruppe von bZIP-Faktoren, welche eine essentielle basische Domäne und ein langes Leuzin-Zipper Motiv aufweisen. Eine ähnliche Aminosäuresequenz zeigen LIP19 aus Reis (*Oryza sativa*) und MLIP15 sowie OCSBF(*ocs binding factor*)-1 aus Mais (*Zea mays*). Diese TFen stehen mit einer geänderten Genexpression bei Kälte und Zellteilung in Verbindung (Singh *et al.*, 1990; Aguan *et al.*, 1993; Kusano *et al.*, 1995).

Ob tatsächlich bZIP-Faktoren an die vorausgesagten regulatorischen Sequenzen der Motivgruppen 6, 9 und 17 binden, bleibt aufgrund der sehr geringen Homologie fraglich. Ein direkter Pathogenbezug konnte nicht hergestellt werden. Ein GCC-bindender, Ethylen-abhängiger Faktor AtEBP, kann mit einem OBF(*ocs binding factor*)-Protein interagieren (Büttner und Singh, 1997). Bei OBFs handelt es sich um TGA-Faktoren. Ocs-Elemente kommen in Promotoren von Abwehr/Stress-Genen vor (Foley und Singh, 2004). Es bleibt ebenso eine Vermutung, aufgrund der Ähnlichkeiten der TFen 910 und 911 mit LIP19, MLIP15 und OCSBF1, das die identifizierten Elemente eine Rolle bei Zellvermehrung oder Reprimierung von Zellteilung besitzen.

4.1.6. Die Motivgruppen 12 und 18 zeigen Ähnlichkeiten zu Promotorelementen der Phenyl-Ammonium-Lyase

Das Sequenzlogo der Motivgruppe 12 (21 Mitglieder) zeigt eine geringe Homologie zu einem Elicitor responsiven Element, welches im PAL(Phenyl-Alanin-Ammoniumlyase)1-Promotor (Lois *et al.*, 1989) in Petersilie (*Petroselinum crispum*) vorkommt (Abbildung 32, Seite 97).

Eine hohe Übereinstimmung zeigt das Sequenzlogo der Motivgruppe 18 (22 Mitglieder) zum AC(Activator)II-Element im Promotor des PAL2-Gens der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.) (Abbildung 38, Seite 100). Das regulatorische Element wurde in transgenen Tabakpflanzen identifiziert (Hatton *et al.*, 1995). Es gibt drei verschiedene AC-Elemente in dem Promotor der Phenyl-Ammonium-Lyase. Diese werden vermutlich von MYB TFen gebunden und vermitteln eine spezifische Genexpression. Das ACII-Element ist für eine spezifische vaskuläre Genexpression zuständig. Zusammen mit einer G-Box vermitteln die verschiedenen AC-Elemente unterschiedliche gewebespezifische Expressionen in histochemischen GUS-Reporter-genexperimenten (Hatton *et al.*, 1995).

Verschiedene Autoren beschreiben unterschiedlich viele MYB TFen in *Arabidopsis*. Das reicht von 189 (Xiong *et al.*, 2005), über 190 (Riechmann *et al.*, 2000), über 198 (Yanhui *et al.*, 2006) bis hin zu 258 (Gong *et al.*, 2004). Die MYB TFen werden aufgrund der Anzahl an MYB-Wiederholungen in drei Gruppen unterteilt: R2R3, R1R2R3 und MYB-verwandte TFen. Pflanzliche MYB-Gene sind sehr komplex und werden nur selten konstitutiv und ubiquitär exprimiert (Gong *et al.*, 2004). Die MYB TFen sind in einer Vielzahl physiologischer Prozesse involviert und werden durch entwicklungsspezifische sowie abiotische Stimuli induziert (Yanhui *et al.*, 2006).

Die *cis*-Elemente dieser Gruppe könnten aufgrund der Homologieähnlichkeit von MYB-Faktoren gebunden werden. Für einen Zusammenhang zu einer Pathogenabwehr dieser Motivgruppen bleibt lediglich zu erwähnen, dass das Gen der PAL bei verschiedenen Abwehrprozessen eine erhöhte Transkriptionsrate aufweist. Elemente, die den AC-Elementen ähneln, könnten

eine durch MYB-Faktoren ausgelöste Genexpressionssteigerung bewirken. Der Zusammenhang zwischen MYB-Faktoren und einer Pathogenabwehr konnte bei einem MYB-ähnlichen Faktor im Promotor der Strictosidinsynthese aufgezeigt werden, welcher an ein Element bindet, das durch Jasmonat induzierbar war (van der Fits *et al.*, 2000).

4.1.7. Die Motive der Gruppen 4, 13 und 33 weisen eine geringe Ähnlichkeit zu Bindungssequenzen von MYB-Faktoren auf

Die Sequenzlogos der Familienprofile von Gruppe 4 (2 Mitglieder, Abbildung 24, Seite 93), der Motivgruppe 13 (7 Mitglieder, Abbildung 33, Seite 97) und der Gruppe 33 (7 Mitglieder, Abbildung 53, Seite 108) zeigen eine geringe Homologie zu Bindungsstellen pflanzlicher MYB-Faktoren. Die MYB TFen stellen die größte Gruppe an TFen, welche bei Pflanzen bekannt sind (Riechmann *et al.*, 2000). Die Consensussequenz der pflanzlichen MYB-Faktoren 5'...MACCWAMC...3' zeigt Ähnlichkeiten zur P-Box, welche in Promotoren der Phenylpropanoid-Biosynthesegene wie PAL (Phenyl-Ammonium-Lyase) oder CHS (Chalcon-Synthase) vorkommt (Hartmann *et al.*, 2005). Die MYB-Faktoren MYB308 und MYB330 aus (*Antirrhinum majus*) regulieren in transgenen Tabakpflanzen die Biosynthese von Phenylpropanoid und Lignin (Tamagnone *et al.*, 1998).

Aufgrund der geringen Sequenzähnlichkeit der Familienprofile der Motivgruppen 4, 13 und 33 kann nur vermutet werden, dass die identifizierten regulatorischen Sequenzen tatsächlich von MYB-Faktoren gebunden werden. Die einzelnen Sequenzlogos der Motive der verschiedenen Gruppen sind generell wenig konserviert und lassen daher Homologievergleiche nur geringfügig zu.

Ein Hinweis auf eine Pathogenantwort dieser regulatorischen Sequenzen könnte der Zusammenhang der aus *Antirrhinum majus* stammenden MYB-Faktoren 308 und 330 und die Induktion von Lignin zeigen, da eine zunehmende Lignifizierung der pflanzlichen Zellwand eine strukturelle Abwehrreaktion der Pflanze gegenüber eindringenden Pathogenen darstellt (Collinge, 2009).

4.1.8. Motivgruppe 8 und 28 zeigen Sequenzhomologien zu Promotorelementen der Glycerin-Aldehyd-Dehydrogenase

Das Sequenzlogo des Familienprofils der Gruppe 8 (3 Mitglieder) zeigt eine teilweise Homologie zu einer Bindungsstelle eines PI-Elementes aus *Arabidopsis* (Abbildung 28, Seite 95). Diese Bindungsstelle befindet sich im Promotor der GAP-B, der B-Untereinheit der plastidären Glycerin-Aldehyd-Dehydrogenase (Chan *et al.*, 2001). Mutationen in diesem Promotorelement führen zu einer Reduktion der Licht-vermittelten Genexpression.

Das Sequenzlogo vom Familienprofil der Gruppe 28 (2 Mitglieder, Abbildung 48, Seite 105) zeigt eine geringe Ähnlichkeiten zur T-Box, einem positiven Modulator der lichtaktivierten Genexpression von GAPB (Chan *et al.*, 2001). Genauso wirken die Elemente PI und PII. TFen, die an diese Elemente binden, sind bislang nicht bekannt.

4.1.9. Motivgruppe 20 charakterisiert Bindestellen von TFen mit einer TCP-Domäne

Die Motivgruppe 20 besteht aus 14 Gruppenmitgliedern. Das Sequenzlogo des Familienprofils zeigt eine Homologie zu einem *siteII*-Element (Abbildung 40, Seite 101), welches in Promotorregionen von Cytochromgenen (Cyt-1, Cyt-2) vorkommt (Welchen und Gonzales, 2005). Das Element kommt häufig in Mehrfachanordnung oder Kombination mit anderen *cis*-Elementen (Telo-Box) in Promotoren vor (Trémousaygue *et al.*, 2003). Die regulatorischen Sequenzen sind vermutlich für Genexpression in meristematischen oder proliferierenden Zellen/Geweben notwendig (Welchem und Gonzales, 2005). Die *cis*-Elemente, die dem *siteII*-Element ähneln, können von TFen gebunden werden, die eine TCP-Domäne besitzen (Trémousaygue *et al.*, 2003). Proteine mit diesen Domänen sind pflanzenspezifisch (Riechmann *et al.*, 2000) und spielen bei Wachstum und Entwicklung eine Rolle (Cubas *et al.*, 1990). Bislang sind in *Arabidopsis* 25 Gene identifiziert, die für ein solches Protein kodieren könnten (Riechmann *et al.*, 2000). Die Regulation dieser TFen umfasst Gene, die in die mitochondriale oxidative Phosphorylierung involviert sind (Welchen und Gonzales, 2006).

Die vorausgesagten regulatorischen Sequenzen dieser Gruppe könnten von Transkriptionsfaktoren mit einer TCP-Domäne gebunden werden. Ein Zusammenhang von diesen pflanzenspezifischen TFen und einer Pathogenabwehrreaktion ist bislang nicht bekannt.

4.1.10. Motivgruppe 24 und 25 zeigen das *cis*-Element GCC-Box

Die Sequenzlogos der Motivgruppen 24 und 25 (56 und 5 Mitglieder) entsprechen eindeutig dem GCC-Element (Abbildung 44, Seite 103; Abbildung 45, Seite 103), welches in der Ethylenantwort eine repräsentative Rolle besitzt. Verschiedene ERFs (*Ethylene-responsive element binding factors*) binden an dieses Element. Viele Gene, die in eine Pathogenantwort involviert sind, besitzen in ihren Promotoren ein GCC-Element (Ohme-Takagi und Shinshi, 1995; Ohme-Takagi *et al.*, 2000). Darunter fallen auch essentielle PR-Gene, die in der Pflanze eine Resistenzantwort vermitteln (Sessa *et al.*, 1995; Shinshi *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1996).

AtERF1, AtERF2 und AtERF5 fungieren als Aktivatoren bei einer GCC-Box abhängigen Genexpression (Fujimoto *et al.*, 2000). AtERF3 und AtERF4 agieren als Repressoren (Fujimoto *et al.*, 2000). Die AtERF-Gene werden differentiell durch abiotischen Stress, wie Verwundung, Kälte, Salzstress oder Hitze reguliert (Fujimoto *et al.*, 2000). Bei Singh *et al.* (2002) wird ERF1 zur TF-Familie der AP2/EREB gezählt. ERF1 reguliert als TF die Resistenz gegenüber nekrotrophen Pilzen wie z. B. *Botrytis cinerea* und *Plectosphaerella cucumerina* (Berrocal-Lobo und Molina, 2004).

Ethylen wird als Mediator für verschiedene abiotische wie biotische Stresse aufgeführt (Abeles *et al.*, 1992). Auffällig ist bei dieser Motivgruppe, dass keine der den Motiven zugrunde liegenden Abfragen den Stimulus Ethylen enthält (Vergleich 3.4. Tabelle 10 mit Anhang 8.7.). In großer Anzahl sind die Ascomyceten *B. cinerea* und *E. orontii*, sowie der Oomycet *P. infestans* mit dem Stimulus MJ vorzufinden, welcher mit Ethylen synergistisch die nekrotrophe Resistenz charakterisiert. Ebenfalls tritt ein Motiv (12LLL_M1) in dieser Gruppe auf, welches auf den Einzelstimulus des nekrotrophen Pilz *B. cinerea* zurückzuführen ist (Anhang 8.7.). Darüber hinaus tritt das PAMP NPP1 auf, welcher aus dem Oomycet *Phytophthora* stammt.

Ein Zusammenhang einer Genexpressionsinduktion durch NPP1 mit einem GCC-verwandten *cis*-Element wurde bislang nicht beschrieben. Diese Motivgruppen 24 und 25 charakterisieren zusammenfassend ein bekanntes *cis*-Element, welches einen Pathogenbezug besitzt.

4.1.11. Motivgruppe 27 besitzt Übereinstimmungen zur W-Box

Das Sequenzlogo der Motivgruppe 27 (26 Mitglieder) zeigt unter anderem eine Homologie zu einer WRKY6-BS aus *Arabidopsis* (Abbildung 47, Seite 105). Das *cis*-Element wird als W-Box (5'...GTCAA...3') bezeichnet. Es wurde erstmals als Elicitor-responsives Element beschrieben, welches im Promotor des PR1-Gens vorkommt (Rushton *et al.*, 1996). Die W-Box ist ein sehr präsesentes *cis*-Element in den Promotoren von Genen mit Pathogenbezug (Maleck *et al.*, 2000).

Diese regulatorische Sequenz wird spezifisch von WRKY TFen gebunden, welche einzigartig in Pflanzen sind (Eulgem *et al.*, 2000). Die WRKY TFen besitzen eine oder zwei konservierte Domänen, welche aus annähernd 60 AS bestehen. Allen gemeinsam ist die WRKYGQK-Domäne, gefolgt von einem Zinkfinger-ähnlichen Motiv. In *Arabidopsis* sind über 70 WRKY-Faktoren bekannt (Ülker und Somssich, 2004). Diese TFen spielen eine große Rolle bei Antworten auf biotischen und abiotischen Stress, sowie in der Pflanzenentwicklung. Die WRKY-Gene selbst werden ebenfalls durch Verwundung, Pathogeninfektion oder abiotischen Stress induziert (Eulgem *et al.* 2000). In *Arabidopsis* werden die Mehrzahl der 72 AtWRKY-Gene nach einer Pathogeninfektion oder durch Behandlung mit PAMPs vermehrt transkribiert (Dong *et al.*, 2003).

Die Rolle von WRKYs bei der Pathogenabwehr ist in der Literatur vielfach beschrieben wurden (Li *et al.*, 2004; Eulgem und Somssich, 2007). AtWRKY18 ist ein positiver Regulator von basalen Abwehrprozessen und der SAR (Xu *et al.*, 2006). AtWRKY70 besitzt vermutlich eine Rolle bei der SA-vermittelte basalen Abwehr gegenüber dem biotrophen Pilz *Erysiphe cichoracearum* und dem Oomycet *Hyaloperonospora parasitica* (Li *et al.*, 2006; Knoth *et al.*, 2007). Es wurde ebenso gezeigt, dass AtWRKY70 für die Abwehr des nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* erforderlich ist (AbuQuamar *et*

al., 2006). AtWRKY70 scheint auf eine SA-abhängige Art und Weise nach einer *B. cinerea* Infektion hochreguliert zu werden. Einige WRKY-Faktoren stehen mit MAPK-Signaltransduktionskaskaden in Verbindung, welche wiederum in die Pathogenantwort involviert sind. Auch besitzen die WRKY-Gene selbst in ihren Promotoren W-Boxen. Das führt zur Annahme einer Auto- bzw. Kreuzregulation der WRKYs (Turck *et al.*, 2004; Robatzek und Somssich, 2002). Das Protein NPR1 scheint zudem funktionell mit den WRKYs in der Immunantwort verlinkt zu sein (Yu *et al.*, 2001). Zusammenfassend sind die potentiellen TFen dieser Motivgruppe in der Familie der WRKY TFen zu vermuten und das spricht für einen Zusammenhang dieser Motivgruppe bei einer Regulation der Pathogenantwort.

4.1.12. Motivgruppe 30 zeigt Homologien zum TL1-Element

Diese Motivgruppe (28 Mitglieder) besitzt eine Ähnlichkeit zum TL1-Element (Abbildung 50, Seite 106). Diese Region befindet sich in 13 Genpromotoren von NPR1 Zielgenen (Wang *et al.*, 2005). Nur bei dem Einzelmotiv 20NNN_M2 dieser Motivgruppe tritt einer dieser 13 Genpromotoren innerhalb der koregulierten Gene auf (Anhang Digital D auf CD-ROM). Das TL1-Element ist vermutlich in eine SA-abhängige Genexpression via NPR1 aktivierend involviert (Wang *et al.*, 2005). Der an das TL1-Element bindende TF ist vermutlich kein TGA-Faktor, da das Element nicht wie ein *as-1*-Element funktioniert (Wang *et al.*, 2005). Das Protein NPR1 ist ein Schlüsselregulator der SAR (Grant und Lamb, 2006). In einer TGA-Triple Mutante wurden vornehmlich sekretorische Proteine induziert. Folglich wird postuliert, dass NPR1 verschiedene Wege zur SAR bereitstellt. Einmal die PR-Genexpression via TGA TFen und zum anderen dessen Sekretion via unbekannte TFen über das TL1-Element (Wang *et al.*, 2005).

Das Signalmolekül SA steht mit der SAR in Verbindung und tritt sehr häufig unter den Stimulikombinationen dieser Motivgruppe zusammen mit den verschiedenen Pilzarten auf (Vergleich 3.4. Tabelle 10 mit Anhang 8.7.). Auch Chitin und in einigen Fällen MJ kommen als Stimuli vor.

Diese große Gruppe an potentiellen *cis*-Elementen könnte ähnlich dem TL1-Element eine regulatorische Rolle in der SA-vermittelten SAR besitzen.

4.1.13. Motivgruppe 34 und 35 zeigen Sequenzähnlichkeiten zu Bindestellen von E2F-Transkriptionsfaktoren

Die Sequenzlogos der Familienprofile von Motivgruppe 34 (2 Mitglieder) und Motivgruppe 35 (2 Mitglieder) zeigen Homologien zu Bindungssequenzen von E2F TFen (Abbildung 54, Seite 108 und Abbildung 55, Seite 109).

E2F TFen sind in tierischen Zellen wichtige Regulatoren bei der Proliferation. Sie sind beim Übergang von der G1-Phase in die S-Phase beim Zellzyklus beteiligt (Stals und Inzé, 2001). Die E2F-ähnlichen TFen sind in Pflanzen ebenfalls an der Regulation der Zellproliferation beteiligt (Kosugi und Ohashi, 2002). Sechs funktionelle AtE2F-Gene wurden in *Arabidopsis* detektiert und in zwei Unterklassen eingeteilt (Mariconti *et al.*, 2002). E2Ff gehört zur zweiten Klasse und besitzt eine Duplikation der DNA-Bindungsdomäne und keine weiteren konservierten Domänen. Bislang liegt ein Zusammenhang dieser TFen zum Ablauf des Zellzyklus vor. Der TF E2F1 bindet an Promotorsequenzen im AtCDC6-Gen, welches den Übergang von Zellen in die S-Phase reguliert (de Jager *et al.*, 2002). CDC6 aus *Arabidopsis* ist Mitglied einer Multigenfamilie.

Es könnte postuliert werden, dass die detektierten Motive dieser Motivgruppen mit Proliferation von Zellen in Verbindung gebracht werden können bzw. für ein Abstoppen der Zellvermehrung im Falle von Seneszenz über Genregulation via E2F-ähnliche TFen notwendig sind.

4.1.14. Die Familienprofile vieler Motivgruppen besitzen geringe Homologien zu bekannten *cis*-Elementen

Zu den Motivgruppen, die entweder nur schwach konservierte Sequenzlogos in ihren Familienprofilen aufwiesen oder nur geringe Homologien zu bekannten *cis*-Elementen zeigten, gehören die Motivgruppen 10 (13 Mitglieder, Seite 96), 11 (10 Mitglieder, Seite 96), 14 (8 Mitglieder, Seite 98), 15 (9 Mitglieder, Seite 98), 16 (3 Mitglieder, Seite 99), 19 (4 Mitglieder, Seite 100), 21 (9 Mitglieder, Seite 101), 22 (3 Mitglieder, Seite 102), 23 (7 Mitglieder, Seite 102), 26 (4 Mitglieder, Seite 104), 29 (3 Mitglieder, Seite 104).

106), 31 (3 Mitglieder, Seite 107), 32 (21 Mitglieder, Seite 107), 36 (4 Mitglieder, Seite 109) und 37 (2 Mitglieder, Seite 110).

Dabei sind die Übereinstimmungen zu den *cis*-Elementen in den DB so gering, dass keine Voraussage zu einer TF-Familie, die an diese Motive binden könnte, erstellt werden kann. In vielen Fällen ist zwar eine geringe Ähnlichkeit zu einem *cis*-Element vorhanden, es kann sich jedoch auch um identifizierte Promotorelemente ohne bekannten, zugehörigen TF handeln. Einen Pathogenbezug abzuleiten, entfällt aus zu spekulativen Gründen ebenso.

4.2. Identifizierung von Pathogen-responsiven *cis*-Elementen, die durch viele Stimuli induziert werden

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung von neuen Pathogen-responsiven *cis*-Elementen, welche in der Pflanze eine Pathogenantwort hervorrufen und in der Anwendung zu resistenten Nutzpflanzen führen können. Ein neuer Aspekt war, möglichst viele verschiedene Stimuli abzufragen, um potentielle Regulatoren zu identifizieren, die der Pflanze eine breite Resistenz gegenüber vielen verschiedenen Pathogenen vermitteln können. Ein breites Spektrum an unterschiedlich vielen koregulierten Genen und sehr variablen Motiven ergaben die Analysen von den Promotorsequenzen, welche bei Abfragen von drei bis vier verschiedener Stimuli erreicht wurden. Um ein potentiell regulatorisches Element zu identifizieren, welches bei Infektion durch die Ascomyceten *B. cinerea* und *E. orontii*, dem Oomycet *P. infestans*, sowie verschiedenen verfügbaren Signalmoleküle und PAMPs induziert ist, wurden komplexe Abfragen durchgeführt. Bei folgenden Abfragen aller drei Pilzexperimente ergaben diese Analyse mindestens 2 koregulierte Gene, sowie ein konserviertes Sequenzmotiv: 3A, 3B, 3C, 3D, 3I, 3J, 3M, 3N, 9B, 9D, 9I, 9J, 9K, 37C, 37D, 37E, 37F, 37P-2, 40A und 40B (Anhang 8.7.; Anhang Digital A auf CD-ROM). Es kann postuliert werden, dass einige dieser Motive der Pflanze eine gesteigerte Genexpression nach einer Pilzinfektion vermitteln könnten.

Die Einzelsequenzen 3C_M1_S1, 37C_M1_S1 und 37D_M1_S1 wurden für die transienten Experimente ausgewählt. Es zeigte sich bei allen drei Einzelsequenzen keine Induktion der Reportergen-Expression durch das Pep25 im Petersilien-Protoplasten System (Abbildung 65, Seite 127). Eventuell sind die erweiterten Randsequenzen aus der natürlichen Promotorsequenz ebenfalls essentiell für die Bindung eines Transkriptionsfaktors. Es konnte zudem keine Funktionalität der drei Konstrukte im Agroinfiltrationssystem nachgewiesen werden (Abbildung 66, Seite 130). Eine potentielle posttranskriptionelle Regulation der ausgewählten Gene durch kleine RNAs wird zumindest nicht vermutet (3.10.).

Die ausgewählte Einzelsequenz 3C_M1_S1 ist ohne erweiterte Promotorsequenz 10x mehr in Promotoren vorzufinden, als theoretisch vermutet. (3.11.) Bei diesen 36 Genpromotoren sind unter anderem Promotoren von TFen, wie z. B. MYB oder unbekannten exprimierten Proteinen vorhanden. Ein Ausblick wäre, von diesem Motiv weitere Einzelsequenzen zu testen, bzw. ein anderes Motiv zu überprüfen, welches bei den oben genannten Abfragen vorkam.

Das Motiv 3C_M1 trat in der Motivgruppe 11 auf, welche aus 10 Motiven bestand. Das Motiv 15AAA_M1 gehört zu den 10 Motiven der Motivgruppe 11. Die Einzelsequenz 15AAA_M1_S1 konnte erfolgreich im heterologen System (3.12.), sowie im Agroinfiltrationssystem getestet werden (3.14.). Daher die Annahme, dass das Motiv 15AAA_M1 oder ähnliche Elemente (z. B: 3C_M1) bei der Regulation der Pathogenabwehr gegenüber multiplen Pilzspezies eine Rolle spielen könnten.

4.3. Funktionalität ausgewählter Einzelsequenzen

Promotoren sind meist modular aufgebaut und die Hauptregulationsbereiche von Genen (Puente *et al.*, 1996; Grimmig und Matern, 1997; Bussemaker *et al.*, 2001). Es liegen mehrere so genannte *cis*-regulatorische Elemente innerhalb eines Promotors vor. *Trans*-aktive Faktoren, die die Transkription des Gens regulieren (Meshi und Iwabuchi, 1995; Lee und Young, 1998) binden an diese *cis*-regulatorischen Elemente. Nach einer Interaktion von mindestens einem *trans*-aktiven Faktor mit dem Multiproteinkomplex der

Transkriptionseinheit wird die Initiierung der Transkription ermöglicht (Nikolov und Burley, 1997). Die Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren sind in verschiedenen Pflanzenspezies hochkonserviert (Liu *et al.*, 1999).

Rushton und Kollegen zeigten 2002, dass potentielle *cis*-Elemente von Genen mit Pathogenbezug in einem transienten Petersilien-Protoplasten System die Expression eines Reportergens nach einer PAMP-Behandlung (Pep25) vermitteln. Eine vierfache Multimerisierung der potentiellen Elemente vermittelte eine deutliche GUS-Aktivität. Stärke und Induzierbarkeit variieren bei verschiedenen *cis*-Elementen.

Die Untersuchung von 17 ausgewählten Einzelsequenzen aus Promotoren koregulierter Pathogen-induzierter Gene ergab, dass drei der potentiellen *cis*-Elemente im heterologen (3.12.) und wiederum drei im homologen System (3.13.) induzierbar waren (siehe unten).

Untersucht wurden sie zum einem in Petersilien-Protoplasten (heterolog), als auch in *Arabidopsis*-Protoplasten (homolog). Die klonierten Einzelsequenzen reichten in ihrer Länge von 24-28 Nukleotiden aus, um als *cis*-Elemente eine Induktion des Reportergens in den Zellen zu erzeugen. Das bedeutet, die Responsivität kann im transienten, heterologen oder homologen System erreicht werden, ohne dass die Elemente in ihrem nativen Promotorkontext vorkommen. Das beweist das Potential dieser Elemente, um in einer kommerziellen Anwendung verwendet zu werden.

Im heterologen System wurden die Einzelsequenzen 18H_M2_S1, 15AAA_M1_S1, 30I-8_M1_S2 positiv als Pep25-induzierbar getestet (3.12.). Im homologen System wurden 30I-8_M1_S1, 30I-8_M1_S2 und 12r_M1_S1 als *AtPep1*- und *AtPep2*-responsiv, sowie 30I-8_M1_S1, 30I-8_M1_S2 als Flg22-induzierbar getestet (3.13.1.). Die Induktion von 30I-8_M1_S2, sowohl durch das pilzliche Peptid Pep25, als auch die bakterielle Peptidvariante Flg22 weist auf eine Multifunktionalität eines *cis*-Elementes bei unterschiedlichen Pathogen-Arten hin (Walther *et al.*, 2007). Das Faktum, dass *cis*-Elemente in Pflanzenspezies hoch konserviert sind und die Tatsache, dass die auslösenden Faktoren einer Immunantwort ebenfalls universell einsetzbar sind (Pep25, Flg22) zeigt, dass die erhaltenen Ergebnisse auf andere

Pflanzenspezies übertragbar wären (Venter *et al.*, 2007). Somit könnten die identifizierten *cis*-Elemente dazu genutzt werden, synthetische Promotoren für transgene Kulturpflanzen zu erstellen, die der Pflanze eine gesteigerte und kontrollierte Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen vermitteln (Gurr *et al.*, 2005). Ruston und Kollegen (2002) konnten fast alle in *Petersilie* transient erhaltenen Daten auch *in planta* bei *Arabidopsis* zeigen. Die Elemente 4xW1, 4xGCC, 4xS und 4xGst zeigten eine lokale Reporter-gen-Expression nach Inokulation von *Arabidopsis* mit dem biotrophen Oomycet *P. parasitica* pv. Cala2, welches eine inkompatible Reaktion mit Col-0 Pflanzen aufweist (Holub *et al.*, 1994; Rushton *et al.*, 2002). Die GUS-Färbung trat am Ort der Infektion auf. Die dafür zuständige Induzierbarkeit wurde den aus ihrem natürlichen Promotorkontext entfernten *cis*-Elementen zugeschrieben. Auch zeigte das 4xW2-Element eine lokale Genexpression am Ort der Infektion mit *P. syringae* pv. tomato mit einem inkompatiblen Isolat (DC3000 +avrRpm1). Weiter präsentierten einige Elemente (4xGCC, 4xS, 4xW1, 4xW2) nach Einschneiden eines Blattes eine lokale Genexpression am Ort der Verwundung. Diese Ergebnisse sprechen für eine Konvergenz zwischen Resistenz und Verwundung. Ein und dasselbe *cis*-Element könnte von verschiedenen TFen gebunden werden, um eine Signaltransduktion entsprechend der Ausgangssituation auszulösen (Walther *et al.*, 2007).

Für eine Anwendung synthetischer Promotoren in Kulturpflanzen ist zudem eine möglichst geringe Hintergrundaktivität gewünscht. Da die beiden Elemente 15AAA_M1_S1 und 30I-8_M1_S2 nur sehr geringe Induktionen (mit Pep25) im heterologen System aufweisen (Abbildung 65, Seite 127), kann in diesen Fällen nicht automatisch von einer geringen Hintergrundaktivität ausgegangen werden (ohne Pep25). Im Fall von 18H_M2_S1 kann positiv vermerkt werden, dass die Hintergrundaktivität nicht sehr hoch ist (ohne Pep25). Eine noch höhere Kopienzahl (8x) führte bei Ruston zu einem höheren Hintergrund als bei dem 4fach-Konstrukt. Bei 18H_M2_S1 wurde ebenfalls die Vervielfachung der Elemente untersucht, jedoch führte die Oktamer-Multimerisierung zu keiner Steigerung der absoluten GUS-Werte (Daten nicht gezeigt). Ein direkter quantitativer Vergleich der 2-fach, 4-fach und 8-fach Konstrukte untereinander ist ohne ein Referenzplasmid zur Transformationskontrolle nicht möglich.

Eine weitere Anwendung der vorausgesagten *cis*-Elemente wäre die Verwendung als molekulare Marker, da sie einen definierten Endpunkt eines Signalweges charakterisieren. Zudem können Pflanze-Pathogen Interaktionen auf molekularer Ebene untersucht werden.

Um die Funktionalität aller klonierten 17 Einzelsequenzen weiter zu charakterisieren, wurden ein *Agrobacterium* Transfektionssystem angewandt (3.14.). Hier zeigte sich, dass zu den bereits im heterologen System positiv induzierbaren Einzelsequenzen 15AAA_M1_S1, 30I-8_M1_S2 und 18H_M2_S1, sowie im homologen System induzierbaren Einzelsequenzen 12r_M1_S1 und 30I-8_M1_S1 die zwei weiteren funktionellen Elemente 15CCC_M1_S1 und 12c_M1_S1 hinzukamen.

Da die Negativkontrolle, die lediglich einen Minimalpromotor vor dem Reportergen trug (TATA-GUS), keine Blaufärbung zeigte, können die tetramerisierten Elemente als funktionell klassifiziert werden. Eine direkte Induktion durch das *Agrobacterium* ist zu vermuten. Hierbei handelt es sich um einen lebenden Organismus, der zum Einbringen der DNA in die Pflanze genutzt wurde. Allerdings bleibt ein direkter Beweis einer Induktion unbeantwortet, da kein Vergleich zu einer Negativkontrolle (ohne *Agrobacterium*-Infektion) gezogen werden konnte.

Gezeigt wurde mit diesem Experiment, dass die als funktionell identifizierten Elemente in der Pflanze eine basale GUS-Expression hervorbringen können. Eine spezielle PAMP-Induktion wurde nicht untersucht. Es kann auch möglich sein, dass die infiltrierten Reportergenkonstrukte durch eine Verwundung an der Infiltrationsstelle eine GUS-Färbung hervorriefen. Es ist bekannt, dass viele Pathogen-induzierbare *cis*-Elemente eine Wundinduzierbarkeit zeigen (Rushton *et al.*, 2002).

Dieses Experiment präsentiert einen Nachweis einer potentiellen Induzierbarkeit und Funktionalität der ausgewählten Einzelsequenzen in einem weiteren transienten System. Ein Ausblick ist die Erstellung von transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen mit diesen Promotorfragmentkonstrukten, um zunächst die Grundaktivität dieser Elemente *in planta* zu zeigen. Darüber hinaus können mit diesen Pflanzen Infektionsexperimente mit verschiedenen Pathogenen durchgeführt werden und die an die *cis*-Elemente bindenden TFen isoliert und identifiziert werden.

Ein Ziel in der Anwendung von synthetischen Promotoren ist es, durch gut definierte regulatorische Elemente eine hoch restriktive Expression von bestimmten (Pathogen-toxischen) Produkten in Nutzpflanzen zu integrieren (Gurr *et al.*, 2005) und zudem eine Expression am Ort der Infektion hervorzurufen, ohne Nebeneffekte für das restliche gesunde Pflanzengewebe zu erhalten. Die synthetischen Promotoren sollen möglichst regulatorische *cis*-Elemente enthalten, die auf verschiedene Pathogen reagieren und somit der Pflanze ein breites Abwehrspektrum gegenüber verschiedenen Pathogenspezies erlauben.

4.3.1. Unterschiedliche Induktion im heterologen bzw. homologen System der Einzelsequenzen 30I-8_M1_S1 und 30I-8_M1_S2

Die Einzelsequenzen 30I-8_M1_S1 und 30I-8_M1_S2 waren in den transienten heterologen bzw. homologen System unterschiedlich induzierbar (3.12. bzw. 3.13.). Der Datenbankabgleich der beiden Einzelsequenzen mit der Datenbank PLACE lieferte aufgrund der unterschiedlichen ergänzten Promotor-Randsequenzen von zwei verschiedenen Genen unterschiedliche Homologieereignisse (3.9.). Beiden Sequenzen gemeinsam ist eine DOF-Bindesequenz. Alle übrigen BS sind unterschiedlich.

30I-8_M1_S2 war im transienten Petersilien-System durch Pep25 induzierbar (3.12.). Die identifizierte Homologie zu einer W-Box aus Reis (*Oryza sativa*) in der ausgewählten Promotorsequenz 30I-8_M1_S2 bestand zwei Mal (3.9.). Nach einer Tetramerisierung sind acht Kopien dieser potentiellen WRKY-BS in dem Konstrukt vorhanden. Die Rolle der WRKYs in Antworten auf Pathogenbefall (Eulgen *et al.*, 2000) und der SAR (Maleck *et al.*, 2000) wurden schon eingehend erläutert (4.1.11.). Dies könnte eine Erklärung sein, warum dieses Element als positiv induzierbar im Petersiliensystem getestet wurde (3.12.). Es scheint, dass die Bindung eines potentiellen WRKY-Faktors die Transkription des Reportergens induziert hat. Anders das Ergebnis im Agroinfiltrationssystem, wo keine Reportergenaktivität gezeigt werden konnte (3.13.). Dementsprechend würden in diesem Fall (evt. basale Abwehr oder Verwundung) die eben vermuteten TFen (WRKYs) nicht binden.

30I-8_M1_S1 zeigte eine Funktionalität im Agroinfiltrationssystem (3.13.). Bei diesem Element könnte eine basale Induktion bzw. eine Reaktion auf Verwundung vermutet werden, welche durch Bindung eines unbekannten Transkriptionsfaktors an die Einzelsequenz 30I-8_M1_S1 eine Reporterexpression hervorrief.

Die ergänzten Promotorbereiche zur Kernsequenz des Motivs 30I-8_M1 führen bei den ausgewählten Einzelsequenzen zu unterschiedlichen Funktionen auf transkriptioneller Ebene. Demnach scheint nicht nur die Kernsequenz des Motivs für die vorausgesagte Bindungssequenz für einen pathogenbezogenen Transkriptionsfaktor essentiell zu sein. Eventuell gibt es benachbarte regulatorische Sequenzen zur Kernsequenz, an welche weitere TFen binden können. Es ist sinnvoll, DB-Abgleiche durchzuführen, um mögliche Rückschlüsse potentiell vorhandender TF-BS bei einer Induktion zuzulassen. Zudem gibt es auch multifunktionale Sequenzelemente, die in der Pflanze je nach Stress oder äußerer Bedingungen durch Bindung verschiedener TFen unterschiedliche transkriptionelle Regulationen (Induktion/Repression) bewirken können (Walther *et al.*, 2007; Walley *et al.*, 2007). Darüber hinaus gibt es im Fall der Transkriptionsinitiation auch ein Zusammenspiel mit Ko-Faktoren, welche ebenfalls bei einer unterschiedlichen Wirkung/Induktion zweier ähnlicher potentieller *cis*-Elemente berücksichtigt werden sollten (Thomas und Chiang, 2006).

Für eine identische Rolle des Kernelementes des Motivs 30I-8_M1 sprechen die Induktionen beider Einzelsequenzen durch Flg22, AtPep1 und AtPep2 im homologen System.

4.3.2. Die Einzelsequenz 18H_M2_S1 ist in verschiedenen transienten Systemen induzierbar und funktionell

Die ausgewählte Einzelsequenz 18H_M2_S1 stammt aus dem Promotor einer potentiellen Matrixmetalloproteinase (Reiser und Rhee, 2005). Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind aus Vertebraten bekannt. Es handelt sich um Zink-abhängige Endopeptidasen, welche in der extrazellulären Matrix Degradierungsreaktionen und Modellierungsreaktionen vornehmen (Borkakoti, 2000). Sie stehen mit dem programmierten Zelltod in Verbindung.

Anhand ihrer Struktur und Funktion werden sie in Untergruppen eingeteilt. Im katalytischen Zentrum besitzen sie die konservierte Consensussequenz HEXXHXXGXXH (Stöcker und Bode, 1995). Ein Beispiel ist die Kollagenase. In Vertebraten haben MMPs eine Rolle in Entwicklung, Embryogenese, Organ-Morphogenese und in Wundheilung. Die erste MMP wurde in höheren Pflanzen in der Sojabohne (*Glycine max*) isoliert (Graham *et al.*, 1991). Für eine weitere MMP aus der Sojabohne zeigten die Autoren Liu *et al.* (2001b) erstmals, dass die Transkriptgehalte der GmMMP2 nach einer fungalen oder bakteriellen Infektion im Gewebe anstiegen. Das Protein zeigte zudem eine Proteinase-Aktivität *in vitro*. In Kürbis (*Cucurbita sativus*) wurde nachgewiesen, dass die Cs1-MMP in Blättern während Seneszenz exprimiert wird. Zudem wird von den Autoren vermutet, dass das Enzym eine Rolle beim programmierten Zelltod besitzt (Delorme *et al.*, 2000). In *Arabidopsis* wurden fünf genomische Sequenzhomologien detektiert (Maidment *et al.*, 1999), wobei Expression in Wurzeln, Blättern, Spross und Blüten vorlag. Für die At1-MMP wurde zudem eine proteolytische Aktivität nachgewiesen (Maidment *et al.*, 1999). Eine MMP aus einer Tabakzellsuspensionskultur (*N. tabacum* cv. BY-2) zeigt eine gesteigerte Genexpression bei Infektion durch bakterielle Pathogene (Schiermeyer *et al.*, 2009). Die eindeutige Rolle von MMPs ist in Pflanzen noch nicht geklärt. Ein Novum zeigt die vorliegende Arbeit mit der Identifizierung eines Pathogen-induzierten *cis*-Elementes im Promotor einer MMP durch einen pilzlichen Elicitor (Pep25).

Die Einzelsequenz 18H_M2_S1 zeigte sowohl im transienten Petersiliensystem eine deutliche Induktion (3.12.), als auch im Agroinfiltrationssystem eine Funktionalität (3.14.). Beim transienten Petersiliensystem wurde die Reportergen-Expression durch den pilzlichen PAMP Pep25 ausgelöst. Eine Erklärung könnte sein, dass das Element eine Rolle in einer Pathogenantwort auf Oomyceten haben könnte. In der Abfrage wurden koregulierte Gene identifiziert, die bei dem PAMP NPP1 induziert sind (Anhang 8.7.). NPP1 stammt wie Pep25 aus *Phytophthora*. Bei der Agroinfiltration kann eine Pathogenantwort entweder durch das Bakterium selbst oder aber durch den Verwundungsstress, welcher beim Injizieren des Bakteriums an der Blattoberfläche entstand, hervorgerufen worden sein. Auch könnte eine basale Abwehrreaktion eine Rolle spielen.

Aufgrund dieser zweimaligen positiven Ergebnisse wurde die Sequenz 18H_M2_S1 im homologen System auf eine Induktion von Flg22, AtPep1 und AtPep2 untersucht, wobei kein positives Ergebnis hinsichtlich einer Induktion feststellbar war (3.13.1.). Offensichtlich agiert dieses Element nicht im homologen System auf die getesteten PAMPs und endogenen Elicitoren. Des weiteren zeigte sich keine Induktion durch applizierte Signalmoleküle wie SA oder MJ (3.13.2.).

Um die Einzelsequenz 18H_M2_S1 weiter zu untersuchen wurden Kombinationen aus dem bekannten D-Element (Rushton *et al.*, 2002) und der Einzelsequenz 18H_M2_S1 im Petersiliensystem überprüft (3.15.). Die Untersuchung von kombinierten Elementen (Abbildung 68) zeigte, dass Konstrukte mit einem 18H_M2_S1-Element in zweifacher bzw. vierfacher Anordnung eine relativ niedrige Grundaktivität (Werte ohne PAMP), bezogen auf die Reporter-gen-Expression, besaßen (3.15.). Allerdings können die absoluten Werte nicht untereinander verglichen werden, da kein Kontrollplasmid hinsichtlich einer Transformationskontrolle kotransformiert wurde. Dies ist für weitere Aussagen unabdingbar, da die Varianz in den erhaltenen Ergebnissen einen direkten quantitativen Vergleich nicht ermöglicht. Solche Elemente mit niedriger Grundaktivität eignen sich in einer späteren Anwendung von synthetischen Promotoren zur Erzeugung resistenter Nutzpflanzen, da sie erst dann in einen aktiven Zustand übergehen, wenn tatsächlich eine Pathogeninfektion vorliegt. So können in der Pflanze mögliche Nebenreaktionen eines exprimierten Toxins oder anderer Proteine gering gehalten werden. Synthetische, kombinierte Promotoren aus sorgfältig ausgewählten verschiedenen *cis*-Elementen sind möglicherweise die besten Pathogen-induzierbaren Promotoren (Rushton *et al.*, 2000).

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer konservierter, Pathogen-responsiver *cis*-Elemente. Dazu wurden Microarrayexperimente der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* genutzt. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die bioinformatische Aufarbeitung der Microarrayexperimente und die Entwicklung von Softwaretools zur Identifizierung Pathogen-koregulierter Gene. Es wurden 510 Datensätze mit koregulierten Genen erhalten. Mit dem Softwarepaket BEST wurden 407 verschiedene Sequenzmotive in den Promotoren der koregulierten Gene detektiert. Ein Motiv besteht aus mehreren ähnlichen Einzelsequenzen. Mit Hilfe des Webserver STAMP wurden die Motive in 37 Motivgruppen klassifiziert. Mit diesen Motivgruppen wurden Familienprofile gebildet, die die Einzelsequenzen aller zugehörigen Motive enthalten. Die Familienprofile sowie die einzelnen Motive wurden mit den in den Datenbanken PLACE, AGRIS und AthaMap verfügbaren *cis*-Elementen bzw. Transkriptionsfaktorbindungsstellen verglichen. Dabei wurden unter anderem Bindungsstellen für TCP-, bZIP-, MYB-, AP2/ERF- und WRKY-Faktoren detektiert. Weiterhin wurde unter den 407 detektierten Motiven eine große Anzahl an Motiven identifiziert, welche keine Homologie zu bekannten Transkriptionsfaktorbindungsstellen aufwiesen. Diese wurden für die Identifizierung neuer Pathogen-responsiver *cis*-Elemente eingesetzt. Dazu wurden aus diesen Motiven 17 Einzelsequenzen für eine experimentelle Untersuchung ausgewählt. Diese Sequenzen haben eine große Ähnlichkeit zum identifizierten Motiv, liegen nah am Transkriptionsstart des jeweiligen Gens und besitzen keine Homologie zu *cis*-Elementen oder Transkriptionsfaktor-Bindestellen mit einem Pathogenbezug. Außerdem wird das Gen nicht posttranskriptionell reguliert. Zusammenfassend ergab sich, dass drei der 17 Einzelsequenzen in einem Petersiliensystem durch den Elicitor Pep25 induzierbar sind. Im homologen *Arabidopsis*-Protoplasten System sind ebenfalls drei Einzelsequenzen durch Flg22-, AtPep1- und AtPep2 induzierbar. In einem Agrobakterien-Infiltrationssystem sind sechs Einzelsequenzen funktionell. Eine besonders deutlich Pathogen-responsive Einzelsequenz wurde mit dem aus der Literatur als Pathogen-induziert bekannten D-Element kombiniert. Dieses Konstrukt zeigte eine geringere

Grundaktivität als das D-Element alleine und eine deutliche Induktion durch Pep25 im Petersilien-Protoplasten System.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, aus bioinformatischen Analysen neue Pathogen-responsive Elemente aus Promotoren koregulierter Gene zu identifizieren.

6. Literaturverzeichnis

Abeles FB (1992) Ethylene in plant biology, 2. Auflage, Academic Press, New York.

Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB (2006) Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**:601-611.

AbuQamar S, Chen X, Dhawan R, Bluhm B, Salmeron J, Lam S, Dietrich RA, Mengiste T (2006) Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in Arabidopsis response to *Botrytis* infection. *Plant J.* **48**:28-44.

Achard P, Renou JP, Berthomé R, Harberd NP, Genschik P (2008) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr Biol.* **18**:656-660.

Agrios GN (1997) Plant Pathology, 4. Auflage, Academic Press, New York.

Aguan K, Sugawara K, Suzuki N, Kusano T (1993) Low-temperature-dependent expression of a rice gene encoding a protein with a leucine-zipper motif. *Mol Gen Genet.* **240**:1-8.

Ahrend, Wiebke (Studienarbeit, 2008) Identifizierung von Motivsequenzen mit Pathogenbezug.

Aist JR (1976) Papillae and related wound plugs of plant cells. *Annu Rev Phytopathol.* **14**:145–163.

Alfano JR, Collmer A (1996) Bacterial pathogens in plants: Life up against the wall. *Plant Cell.* **8**:1683-1698.

Altenbach D, Robatzek S (2007) Pattern recognition receptors: from cell surface to intracellular dynamics. *Mol Plant Microbe Interact.* **20**:1031-1039.

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* **55**:373-399.

Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* **408**:796-815.

Aravind L, Koonin EV (1999) Fold prediction and evolutionary analysis of the POZ domain: structural and evolutionary relationship with the potassium channel tetramerization domain. *J Mol Biol.* **285**:1353-1361.

Armstrong GA, Weisshaar B, Hahlbrock K (1992) Homodimeric and heterodimeric leucine zipper proteins and nuclear factors from parsley recognize diverse promoter elements with ACGT cores. *Plant Cell.* **4**:525-537.

- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J** (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*. **415**:977-983.
- Bailey TL, Elkan C** (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*. **2**:28-36.
- Barrett T, Edgar R** (2006) Gene expression omnibus: microarray data storage, submission, retrieval, and analysis. *Methods Enzymol*. **411**:352-69.
- Baum K, Wienand U, Meier I** (1999) Reduction of G-box binding factor DNA binding activity, but not G-box binding factor abundance, causes the downregulation of *RBCS2* expression during early tomato fruit development. *FEBS Lett*. **454**:95-109.
- Beckers GJ, Spoel SH** (2006). Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. *Plant Biol*. **8**:1-10.
- Bent AF, Mackey D** (2007) Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol*. **45**:399-436.
- Berrocal-Lobo M, Molina A** (2004) Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact*. **17**:763-770.
- Bindschedler LV, Dewdney J, Blee KA, Stone JM, Asai T, Plotnikov J, Denoux C, Hayes T, Gerrish C, Davies DR, Ausubel FM, Bolwell GP** (2006) Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant J*. **47**:851-863.
- Boller T** (1991) Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In: Mattoo AK, Suttle JC, eds. The plant hormone ethylene. Boca Raton, FL: CRC Press, 293–314.
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish, Minibayeva F** (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three component system. *J Exp Bot*. **53**:1367-1376.
- Borkakoti N** (2004) Matrix metalloprotease inhibitors: design from structure. *Biochem Soc Trans*. **32**:17-20.
- Bradford MM** (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. **72**:248–254.
- Brazma A, Kapushesky M, Parkinson H, Sarkans U, Shojatalab M** (2006) Data storage and analysis in ArrayExpress. *Methods Enzymol*. **411**:370-386.
- Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, Luo S, McCurdy S, Foy M, Ewan M, Roth R, George D, Eletr S, Albrecht G, Vermaas E, Williams SR, Moon K, Burcham T, Pallas M, DuBridge RB, Kirchner J, Fearon K, Mao J, Corcoran K** (2000) Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat Biotechnol*. **18**:630-634.

Breschke J (1991) Nutzpflanzen, 1. Auflage, Moewig Verlag, Rastatt.

Breyne P, Zabeau M (2001) Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Curr Opin Plant Biol.* **4**:136-142.

Brodersen P, Petersen M, Bjørn Nielsen H, Zhu S, Newman MA, Shokat KM, Rietz S, Parker J, Mundy J (2006) Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J.* **47**:532-546.

Brown RL, Kazan K, McGrath KC, Maclean DJ, Manners JM (2003) A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the *PDF1.2* gene of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **132**:1020-1032.

Brunner F, Rosahl S, Lee J, Rudd JJ, Geiler C, Kauppinen S, Rasmussen G, Scheel D, Nürnberger T (2002) Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *EMBO J.* **21**:6681-6688.

Bülow L, Steffens NO, Galuschka C, Schindler M, Hehl R (2006) AthaMap: from in silico data to real transcription factor binding sites. *In Silico Biol.* **6**:243-252.

Bülow L, Schindler M, Hehl R (2007) PathoPlant: a platform for microarray expression data to analyze co-regulated genes involved in plant defense responses. *Nucleic Acids Res.* **35**:D841-845.

Bülow L, Engelmann S, Schindler M, Hehl R (2009) AthaMap, integrating transcriptional and post-transcriptional data. *Nucleic Acids Res.* **37**:D983-986.

Büttner M, Singh KB (1997) *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:5961-5966.

Busk PK, Jensen AB, Pagès M (1997) Regulatory elements in vivo in the promoter of the abscisic acid responsive gene *rab17* from maize. *Plant J.* **11**:1285-1295.

Busk PK, Pagès M (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol.* **37**:425-435.

Bussemaker HJ, Li H, Siggia ED (2001) Regulatory element detection using correlation with expression. *Nat Genet.* **27**:167-171.

Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X (1997) The Arabidopsis *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell.* **88**:57-63.

Cao H, Li X, Dong X (1998) Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:6531-6536.

- Carimi F, Zottini M, Formentin E, Terzi M, Lo Schiavo F** (2003) Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta*. **216**:413-421.
- Chan CS, Guo L, Shih MC** (2001) Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*. **46**:131-141.
- Che D, Jensen S, Cai L, Liu JS** (2005) BEST: binding-site estimation suite of tools. *Bioinformatics*. **21**:2909-11.
- Chen PY, Wang CK, Soong SC, To KY** (2003) Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Mol Breed*. **11**:287-293.
- Chen YH, Martin C, Toledo-Ortiz G, Quail PH, Huq E, Heim MA, Jakoby M, Werber M, Weisshaar B** (2006) The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol*. **60**:107-124.
- Cheong YH, Yoo CM, Park JM, Ryu GR, Goekjian VH, Nagao RT, Key JL, Cho MJ, Hong JC** (1998) STF1 is a novel TGACG-binding factor with a zinc-finger motif and a bZIP domain which heterodimerizes with GBF proteins. *Plant J*. **15**:199-209.
- Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G** (2006) The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**:465-476.
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*. **448**:497-500.
- Chini A, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, García-Casado G, López-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, Solano R** (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*. **448**:666-671.
- Chisholm, ST, Coaker, G, Day, B, Staskawicz, BJ** (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*. **124**:803-814.
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY** (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem*. **275**:1723-1730.
- Cluis CP, Mouchel CF, Hardtke CS** (2004) The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *Plant J*. **38**:332-347.
- Collinge DB** (2009) Cell wall appositions: the first line of defence. *J Exp Bot*. **60**:351-352.
- Craigon DJ, James N, Okyere J, Higgins J, Jotham J, May S** (2004) NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service. *Nucleic Acids Res*. **32**:D575-577.

- Cubas P, Lauter N, Doebley J, Coen E** (1999) The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J.* **18**:215-222.
- Dangl JL, Jones JD** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* **411**:826-833.
- Dangl JL, McDowell JM** (2006) Two modes of pathogen recognition by plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 8575–8576.
- Davuluri RV, Sun H, Palaniswamy SK, Matthews N, Molina C, Kurtz M, Grotewold E** (2003) AGRIS: Arabidopsis Gene Regulatory Information Server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors. *BMC Bioinformatics.* **4**:25.
- de Jager SM, Menges M, Bauer UM, Murra JA** (2001) Arabidopsis E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene AtCDC6 and is a member of a multigene family with differential activities. *Plant Mol Biol.* **47**:555-568.
- de Vetten NC, Ferl RJ** (1994) Transcriptional regulation of environmentally inducible genes in plants by an evolutionary conserved family of G-box binding factors. *Int J Biochem.* **26**:1055-1068.
- Deblaere, R; Bytebier, B; De Greve, H; Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J** (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* **13**:4777-4788.
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature.* **394**:585-588.
- Delorme VG, McCabe PF, Kim DJ, Leaver CJ** (2000) A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiol.* **123**:917-927.
- Després C, Chubak C, Rochon A, Clark R, Bethune T, Desveaux D, Fobert RR** (2003). The Arabidopsis NPR1 Disease Resistance Protein Is a Novel Cofactor That Confers Redox Regulation of DNA Binding Activity to the Basic Domain/Leucine Zipper Transcription Factor TGA1. *Plant Cell.* **15**:2181–2191.
- Dixon, RA** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature.* **411**:843-847.
- Dong J, Chen C, Chen Z** (2003) Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol.* **51**:21-37.
- Du H, Zhang L, Liu L, Tang XF, Yang WJ, Wu YM, Huang YB, Tang YX** (2009) Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry Mosc.* **74**:1-11.
- Du L, Ali GS, Simons KA, Hou J, Yang T, Reddy AS, Poovaiah BW** (2009) Ca⁽²⁺⁾/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature.* **457**:1154-1158.

- Durrant WE, Dong X** (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol.* **42**:185-209.
- Elliott KA, Shirsat AH** (1998) Promoter regions of the *extA* extensin gene from *Brassica napus* control activation in response to wounding and tensile stress. *Plant Mol Biol.* **37**:675-687.
- Eskin E und Pevzner PA** (2002) Finding composite regulatory patterns in DNA sequences. *Bioinformatics* **18**:354-363.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE** (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* **5**:199–206.
- Eulgem T, Weigman VJ, Chang HS, McDowell JM, Holub EB, Glazebrook J, Zhu T, Dangi JL** (2004) Gene expression signatures from three genetically separable resistance gene signaling pathways for downy mildew resistance. *Plant Physiol.* **135**:1129-44.
- Eulgem T** (2005) Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Sci.* **10**:71-8.
- Eulgem T** (2006) Dissecting the WRKY web of plant defense regulators. *PLoS Pathog.* **2**:e126.
- Eulgem T, Somssich IE** (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol.* **10**:366-371.
- Ezcurra I, Wycliffe P, Nehlin L, Ellerström M, Rask L** (2000) Transactivation of the *Brassica napus* napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved B2 and B3 domains of ABI3 with different *cis*-elements: B2 mediates activation through an ABRE, whereas B3 interacts with an RY/G-box. *Plant J.* **24**:57-66.
- Fan W, Dong X** (2002) In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **14**:335-347.
- Fan J, Hill L, Crooks C, Doerner P, Lamb C** (2009) Absciscic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. *Plant Physiol.* *Epub ahead of print.*
- Feldbrügge M, Sprenger M, Hahlbrock K, Weisshaar B** (1997) PcMYB1, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts in vivo with a light-regulatory promoter unit. *Plant J.* **11**:1079-1093.
- Felix G, Grosskopf DG, Regenass M, Boller T** (1991) Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:8831-8834.
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* **18**:265-276.

- Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, Chen L, Yu L, Iglesias-Pedraz JM, Kircher S, Schäfer E, Fu X, Fan LM, Deng XW** (2008) Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*. **451**:475-479.
- Finkelstein R, Gampala SS, Lynch TJ, Thomas TL, Rock CD** (2005) Redundant and distinct functions of the ABA response loci ABA-INSENSITIVE(ABI)5 and ABRE-BINDING FACTOR (ABF)3. *Plant Mol Biol*. **59**:253-267.
- Flor, HH**, (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol*. **9**:275-296.
- Foley RC, Singh KB** (2004) TGA5 acts as a positive and TGA4 acts as a negative regulator of ocs element activity in *Arabidopsis* roots in response to defence signals. *FEBS Lett*. **563**:141-145.
- Foster R, Izawa T, Chua NH** (1994) Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. *FASEB J*. **8**:192-200.
- Franke W** (1997) Nutzpflanzenkunde. Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen. 6. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE** (2006) Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol*. **7**:1250-1257.
- Fritz-Laylin LK, Krishnamurthy N, Tör M, Sjölander KV, Jones JD** (2005) Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **138**:611-623.
- Fujimoto SY, Ohta M, Usui A, Shinshi H, Ohme-Takagi M** (2000) *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell*. **12**:393-404.
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J** (1993) Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Science*. **261**:754-756.
- Galuschka C, Schindler M, Bülow L, Hehl R** (2007) AthaMap web tools for the analysis and identification of co-regulated genes. *Nucleic Acids Res*. **35**:D857-862.
- Gill G** (2001) Regulation of the initiation of eukaryotic transcription. *Essays Biochem*. **37**:33-43.
- Giraudat J, Parcy F, Bertauche N, Gosti F, Leung J, Morris PC, Bouvier-Durand M, Vartanian N** (1994) Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Mol Biol*. **26**:1557-1577.
- Giuliano G, Pichersky E, Malik VS, Timko MP, Scolnik PA, Cashmore AR** (1988) An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85**:7089-7093.

- Glazebrook J** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* **43**:205-227.
- Görlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H, Ryals J** (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell.* **8**:629-643.
- Gómez-Gómez L, Boller T** (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell.* **5**:1003-1011.
- Gong W, Shen YP, Ma LG, Pan Y, Du YL, Wang DH, Yang JY, Hu LD, Liu XF, Dong CX, Ma L, Chen YH, Yang XY, Gao Y, Zhu D, Tan X, Mu JY, Zhang DB, Liu YL, Dinesh-Kumar SP, Li Y, Wang XP, Gu HY, Qu LJ, Bai SN, Lu YT, Li JY, Zhao JD, Zuo J, Huang H, Deng XW, Zhu YX** (2004) Genome-Wide ORFeome Cloning and Analysis of Arabidopsis Transcription Factor Genes. *Plant Physiol.* **135**:773–782.
- Gowik U, Burscheidt J, Akyildiz M, Schlue U, Koczor M, Streubel M, Westhoff P**, (2004) *cis*-Regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the C4 plant *Flaveria trinervia*, the promoter of the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene. *Plant Cell.* **16**:1077-1090.
- Grant M, Lamb C** (2006) Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol.* **9**:414-420.
- Grimmig B, Matern U** (1997) Structure of the parsley caffeoyl-CoA O-methyltransferase gene, harbouring a novel elicitor responsive cis-acting element. *Plant Mol Biol.* **33**:323-341.
- Guha TD und Stormo DG** (2001) Identifying combinatorial regulation of transcription factors and binding motifs. *Bioinformatics* **17**:608-621.
- Guo A, He K, Liu D, Bai S, Gu X, Wei L, Luo J** (2005) DATF: a database of *Arabidopsis* transcription factors. *Bioinformatics* **21**:2568-2569.
- Gurr SJ, Rushton PJ** (2005) Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? *Trends Biotechnol.* **23**:275-290.
- Hahlbrock K, Scheel D** (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **40**:347-369.
- Hamilton CM** (1997) A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA. *Gene.* **200**:107-116.
- Hampsey M** (1998) Molecular genetics of RNA polymerase II general transcription machinery. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**:465-503.
- Harberd NP** (2003) Botany. Relieving DELLA restraint. *Science.* **299**:1853-1854.
- Hartley RW** (1989) Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together. *Trends Biochem Sci.* **14**:450-454.

- Hartmann U, Sagasser M, Mehrstens F, Stracke R, Weisshaar B** (2005) Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Mol Biol.* **57**:155-171.
- Hatton D, Sablowski R, Yung MH, Smith C, Schuch W, Bevan M** (1995) Two classes of cis sequences contribute to tissue-specific expression of a *PAL2* promoter in transgenic tobacco. *Plant J.* **7**:859-876.
- Hattori T, Terada T, Hamasuna S** (1995) Regulation of the *Osem* gene by abscisic acid and the transcriptional activator VP1: analysis of cis-acting promoter elements required for regulation by abscisic acid and VP1. *Plant J.* **7**:913-925.
- Heath MC** (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol.* **3**:315-319.
- Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AME, He K, Li J, Schroeder JI, Peck SC, Rathjen JP** (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**:12217–12222.
- Heil M, Ton J** (2008) Long-distance signalling in plant defence. *Trends Plant Sci.* **13**:264-272.
- Hennig L, Menges M, Murray JAH, Grissem W** (2003) *Arabidopsis* transcript profiling on Affymetrix GeneChip arrays. *Plant Mol Biol.* **53**:457–465.
- Hertz GZ, Stormo GD** (1999). Identifying DNA and protein patterns with statistically significant alignments of multiple sequences. *Bioinformatics.* **15**:563-577.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Higo H** (1999) PLACE: a database of plant cis-acting regulatory DNA elements. *Nucleic Acids Res.* **26**: 358–359.
- Hobo T, Kowyama Y, Hattori T** (1999) A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:15348-15353.
- Holloway AJ, van Laar RK, Tothill RW, Bowtell DD** (2002) Options available-from start to finish-for obtaining data from DNA microarrays II. *Nat Genet.* **32**:481-489.
- Holub EB, Beynon JL, Crute I.R** (1994). Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**:223–239.
- Huffaker A, Pearce G, Ryan CA** (2006) An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:10098-10103.
- Hudson ME, Quail PH** (2003) Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. *Plant Physiol.* **133**:1605-1616.

- Iida K, Seki M, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Toyoda T, Konagaya A, Shinozaki K** (2005) RARTF: database and tools for complete sets of *Arabidopsis* transcription factors. *DNA Res.* **12**: 247-256.
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F** (2002) bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **7**:106-11.
- James WC, Teng PS, Nutter FW** (1990) Estimated losses of crops from plant pathogens. CRC Handbook of Pest Management, vol 1. Edited by Pimentel bD. Boca Raton, FL: CRC Press; 15-50.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987). GUS fusions: betaglucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**:3901-3907.
- Jensen ST, Liu JS** (2004) BioOptimizer: a Bayesian scoring function approach to motif discovery. *Bioinformatics.* **20**:1557-1564.
- Jones JD, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature.* **444**:323-329.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B** (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol.* **57**:19-53.
- Kagaya Y, Ohmiya K, Hattori T** (1999) RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res.* **27**:470-478.
- Kang JY, Choi HI, Im MY, Kim SY** (2002) Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell.* **14**:343-357.
- Karin M** (1990) Too many transcription factors: positive and negative interactions. *New Biol.* **2**:126-131.
- Katagiri F, Chua NH** (1992) Plant transcription factors: present knowledge and challenge. *Trends Genet.* **8**:22–27.
- Kauffmann S, Legrand M, Geoffroy P, Fritig B** (1987) Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3-beta-glucanase activity. *EMBO J.* :3209–3212.
- Kempken F, Kempken R** (2006) Gentechnik bei Pflanzen, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Kesarwani M, Yoo J, Dong X** (2007) Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **144**(1):336-346.
- Kim KN, Guiltinan MJ** (1999) Identification of *cis*-acting elements important for expression of the starch-branching enzyme I gene in maize endosperm. *Plant Physiol.* **121**(1):225-236.

- Kim HS, Delaney TP** (2002) Over-expression of TGA5, which encodes a bZIP transcription factor that interacts with NIM1/NPR1, confers SAR-independent resistance in *Arabidopsis thaliana* to *Peronospora parasitica*. *Plant J.* **32**:151-163.
- Kim MG, Geng X, Lee SY, Mackey D** (2009) The *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpm1 induces significant defenses by activating the Arabidopsis nucleotide-binding leucine-rich repeat protein RPS2. *Plant J.* **57**:645-653.
- Kinkema M, Fan W, Dong X** (2000) Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell.* **12**:2339-2350.
- Kirik V, Kölle K, Miséra S, Bäumllein H** (1998) Two novel MYB homologues with changed expression in late embryogenesis-defective Arabidopsis mutants. *Plant Mol Biol.* **37**:819-827.
- Kirsch C, Takamiya-Wik M, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich, IE** (2000). A novel regulatory element involved in rapid activation of parsley *ELI7* gene family members by fungal elicitor or pathogen infection. *Mol Plant Pathol.* **1**:243-251.
- Kirsch C, Logemann E, Lippok B, Schmelzer E, Hahlbrock K** (2001). A highly specific Pathogen-responsive promoter element from the immediate-early activated *CMPG1* gene in *Petroselinum crispum*. *Plant J.* **26**:1-12.
- Klessig DF, Yang Y** (1999) Genes associated with enhanced disease resistance in plants. US Patent 1999, 5 939 601.
- Knoth C, Ringler J, Dangl JL, Eulgem T** (2007) *Arabidopsis* WRKY70 is required for full *RPP4*-mediated disease resistance and basal defense against *Hyaloperonospora parasitica*. *Mol Plant Microbe Interact.* **20**:120-128.
- Kosugi S, Ohashi Y** (2002) E2F sites that can interact with E2F proteins cloned from rice are required for meristematic tissue-specific expression of rice and tobacco proliferating cell nuclear antigen promoters. *Plant J.* **29**:45-59.
- Kropat J, Tottey S, Birkenbihl, RP Depege N, Huijser P, Merchant S** (2005) A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**:18730-18735.
- Kusano T, Berberich T, Harada M, Suzuki N, Sugawara K** (1995) A maize DNA-binding factor with a bZIP motif is induced by low temperature. *Mol Gen Genet.* **248**:507–517.
- Lacombe E, van Doorselaere J, Boerjan W, Boudet AM, Grima-Pettenati J** (2000) Characterization of *cis*-elements required for vascular expression of the *cinnamoyl CoA reductase* gene and for protein-DNA complex formation. *Plant J.* **23**: 663-676.
- Latchman DS** (1997) Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol.* **29**:1305-1312.

- Lawton MA, Dean SM, Dron M, Kooter JM, Kragh KM, Harrison MJ, Yu L, Tanguay L, Dixon RA, Lamb CJ** (1991) Silencer region of a chalcone synthase promoter contains multiple binding sites for a factor, SBF-1, closely related to GT-1. *Plant Mol Biol.* **16**:235-249.
- Lawton K, Weymann K, Friedrich L, Vernooij B, Uknes S, Ryals J** (1995) Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. *Mol Plant Microbe Interact.* **8**:863-870.
- Lee TI, Young RA** (1998) Regulation of gene expression by TBP-associated proteins. *Genes Dev.* **12**:1398-1408.
- Legrand M, Kauffmann S, Geoffroy P, Fritig B** (1987) Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **84**:6750–6754.
- Lelievre JM, Oliveira LO, Nielsen NC** (1992) 5'CATGCAT-3' Elements Modulate the Expression of Glycinin Genes. *Plant Physiol.* **98**(1):387-391.
- Leon-Reyes A, Spoel SH, De Lange ES, Abe H, Kobayashi M, Tsuda S, Millenaar FF, Welschen RA, Ritsema T, Pieterse CM** (2009) Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiol.* **149**:1797-1809.
- Lessard PA, Allen RD, Bernier F, Crispino JD, Fujiwara T, Beachy RN** (1991) Multiple nuclear factors interact with upstream sequences of differentially regulated beta-conglycinin genes. *Plant Mol Biol.* **16**:397-413.
- Li J, Brader G, Kariola T, Palva ET** (2004) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell.* **16**:319-331.
- Li J, Brader G, Kariola T, Palva ET** (2006) WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J.* **46**:477-491.
- Liang P, Pardee AB** (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* **257**:967-971.
- Liu L, White MJ, MacRae TH** (1999) Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation. *Eur J Biochem.* **262**:247-257.
- Liu X, Brutlag DL, Liu JS** (2001a) BioProspector: discovering conserved DNA motifs in upstream regulatory regions of co-expressed genes. *Pac Symp Biocomput.* **2001**:127-138.
- Liu Y, Dammann C, Bhattacharyya MK** (2001b) The matrix metalloproteinase gene *GmMMP2* is activated in response to pathogenic infections in soybean. *Plant Physiol.* **127**:1788-1797.
- Loake G, Grant M** (2007) Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol.* **10**:466-472.

- Lois R, Dietrich A, Hahlbrok K, Schulz W** (1989) A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure regulation and identification of elicitor and light responsive *cis*-acting elements. *EMBO J.* **8**:1641-1648.
- Lu C, Tej SS, Luo S, Haudenschield CD, Meyers BC, Green PJ** (2005) Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science.* **309**:1567-1569.
- Ma W, Dong FF, Stavrinides J, Guttman DS** (2006) Type III effector diversification via both pathoadaptation and horizontal transfer in response to a coevolutionary arms race. *PLoS Genet.* **2**:e209.
- Machens, Fabian** (Diplomarbeit, 2008) Funktionelle Analyse potentiell pathogenresponsiver *cis*-Elemente aus *Arabidopsis thaliana*.
- Mahony S, Benos PV** (2007) "STAMP: a web tool for exploring DNA-binding motif similarities". *Nucleic Acids Research* **35**:W253-258.
- Maidment JM, Moore D, Murphy GP, Murphy G, Clark IM** (1999) Matrix metalloproteinase homologues from *Arabidopsis thaliana*. Expression and activity. *J Biol Chem.* **274**:34706-34710.
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA** (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet.* **26**:403-10.
- Mariani C, De Beukeleer M, Truettner J, Leemans J, Goldberg RB** (1990) Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature.* **347**:737-741.
- Mariconti L, Pellegrini B, Cantoni R, Stevens R, Bergounioux C, Cella R, Albani D** (2002) The E2F family of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants. *J Biol Chem.* **277**:9911-9919.
- Martin JT** (1964) Role of cuticle in the defense against plant disease. *Annu Rev Phytopathol.* **2**:81-100.
- Martin GB** (1999) Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Curr Opin Plant Biol.* **2**:273-9.
- Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G** (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol.* **54**:23-61.
- Martinez E** (2002) Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol. Biol.* **50**: 925-947.
- Martínez IM, Chrispeels MJ** (2003) Genomic analysis of the unfolded protein response in *Arabidopsis* shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell.* **15**:561-576.

- Martínez-García JF, Moyano E, Alcocer MJ, Martin C** (1998) Two bZIP proteins from *Antirrhinum* flowers preferentially bind a hybrid C-box/G-box motif and help to define a new sub-family of bZIP transcription factors. *Plant J.* **13**:489-505.
- Matarasso N, Schuster S, Avni A** (2005) A novel plant cysteine protease has a dual function as a regulator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase gene expression. *Plant Cell.* **17**:1205-1216.
- Matys V, Kel-Margoulis OV, Fricke E, Liebich I, Land S, Barre-Dirrie A, Reuter I, Chekmenev D, Krull M, Hornischer K, Voss N, Stegmaier P, Lewicki-Potapov B, Saxel H, Kel AE, Wingender E** (2006) TRANSFAC and its module TRANSCOMP: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **34**:D108-110.
- Mauch-Mani B, Mauch F** (2005) The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol.* **8**:409-414.
- Maxwell BB, Andersson CR, Poole DS, Kay SA, Chory J** (2003). HY5, Circadian Clock-Associated 1, and a cis-element, DET1 dark response element, mediate DET1 regulation of *chlorophyll a/b-binding protein 2* expression. *Plant Physiol.* **133**:1565-1577.
- Menkens AE, Schindler U, Cashmore AR** (1995) The G-box: an ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem. Sci.* **20**:506–510.
- Meshi T, Iwabuchi M** (1995) Plant transcription factors. *Plant Cell Physiol.* **36**:1405-1420.
- Michelmore RW, Meyers BC** (1998) Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Res.* **8**:1113-1130.
- Mishra NS, Tuteja R, Tuteja N** (2006) Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch Biochem Biophys.* **452**:55-68.
- Moffat AS** (2001) Finding new ways to fight plant diseases. *Science.* **292**:2270-2273.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiologia Plantarum* **15**:493-497.
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H** (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.* **140**:411-432.
- Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujioka S, Arai Y, Sekimata K, Takatsuto S, Yamaguchi I, Yoshida S** (2003) Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J.* **33**:887-898.
- Navarro L, Bari R, Achard P, Lisón P, Nemri A, Harberd NP, Jones JD** (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol.* **18**:650-655.

- Nei M, Rooney AP** (2005) Concerted and Birth-and-Death Evolution of Multigene Families. *Annu Rev Genet.* 39:121–152.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT** (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot.* 53:1237-47.
- Ngai N, Tsai FY, Coruzzi G** (1997) Light-induced transcriptional repression of the pea *AS1* gene: identification of *cis*-elements and transactors. *Plant J.* 12:1021-1234.
- Nikolov DB, Burley SK** (1997) RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:15-22.
- Nürnberg T, Nennstiel D, Jabs T, Sacks WR, Hahlbrock K, Scheel D** (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell.* 78:449-60.
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L** (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev.* 198:249-266.
- Nürnberg T, Kemmerling B** (2006) Receptor protein kinases-pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends Plant Sci.* 11:519-522.
- Obayashi T, Hayashi S, Saeki M, Ohta H, Kinoshita K** (2009) ATTED-II provides coexpressed gene networks for *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* 37:D987-991.
- Oerke EC** (1994) Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops, Elsevier-Verlag, Amsterdam.
- Oh DH, Kwon CS, Sano H, Chung WI, Koizumi N** (2003) Conservation between animals and plants of the *cis*-acting element involved in the unfolded protein response. *Biochem Biophys Res Commun.* 301:225-230.
- Ohme-Takagi M, Shinshi H** (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell.* 7:173-82.
- Ohme-Takagi M, Suzuki K, Shinshi H** (2000) Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. *Plant Cell Physiol.* 41:1187-1189.
- Ohtsubo N, Mitsuhara I, Koga M, Seo S, Ohashi Y** (1999) Ethylene promotes the necrotic lesion formation and basic PR gene expression in TMV-infected tobacco. *Plant Cell Physiol.* 40:808-817.
- Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D** (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10:2657-2683.
- Palaniswamy SK, James S, Sun H, Lamb RS, Davuluri RV, Grotewold E** (2006) AGRIS and AtRegNet. A platform to link *cis*-regulatory elements and transcription factors into regulatory networks. *Plant Physiol.* 140:818-829.
- Pauli S, Rothnie HM, Chen G, He X, Hohn T** (2004) The cauliflower mosaic virus 35S promoter extends into the transcribed region. *J Virol.* 78:12120-12128.

Peck SC (2003) Early phosphorylation events in biotic stress. *Curr Opin Plant Biol.* **6**:334-338.

Pedras MSC, Zaharia IL, Gai Y, Zhou Y, Ward DE (2001) In planta sequential hydroxylation and glycosylation of a fungal phytotoxin: Avoiding cell death and overcoming the fungal invader. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:747–752.

Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klessig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J (2000) *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell.* **103**:1111-1120.

Pieterse CM, van Loon LC (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol.* **7**:456-464.

Puente P, Wei N, Deng XW (1996) Combinatorial interplay of promoter elements constitutes the minimal determinants for light and developmental control of gene expression in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **15**:3732-3743.

Qu LJ, Zhu YX (2006) Transcription factor families in *Arabidopsis*: major progress and outstanding issues for future research. *Curr Opin Plant Biol.* **9**:544-549.

Quan LJ, Zhang B, Shi WW, Li HY (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J Integr Plant Biol.* **50**:2-18.

Ramonell KM, Zhang B, Ewing RM, Chen Y, Xu D, Stacey G, Somerville S (2002) Microarray analysis of chitin elicitation in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology.* **3**:301-311.

Redman JC, Haas BJ, Tanimoto G, Town CD (2004) Development and evaluation of an *Arabidopsis* whole genome Affymetrix probe array. *Plant J.* **38**:545-561.

Reinbothe S, Mollenhauer B, Reinbothe C (1994) JIPs and RIPs: the regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell.* **6**:1197-1202.

Reiser L, Rhee SY (2005) Using the *Arabidopsis* Information Resource (TAIR) to find information about *Arabidopsis* genes. *Curr Protoc Bioinformatics.* Chapter 1:Unit 1.11.

Reményi A, Schöler HR, Wilmanns M (2004) Combinatorial control of gene expression. *Nat Struct Mol Biol.* **11**:812-815.

Rhee SY, Beavis W, Berardini TZ, Chen G, Dixon D, Doyle A, Garcia-Hernandez M, Huala E, Lander G, Montoya M, Miller N, Mueller LA, Mundodi S, Reiser L, Tacklind J, Weems DC, Wu Y, Xu I, Yoo D, Yoon J, Zhang P (2003) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a model organism database providing a centralized, curated gateway to *Arabidopsis* biology, research materials and community. *Nucleic Acids Res.* **31**:224-228.

- Riaño-Pachón DM, Ruzicic S, Dreyer I, Mueller-Roeber B (2007)** PlnTFDB: an integrative plant transcription factor database. *BMC Bioinformatics*. **8**:42.
- Richter G (1998)** Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, 6. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Riechmann JL, Ratcliffe OJ (2000)**. A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**:423–434.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G (2005)** Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*. **290**:2105-2110.
- Robatzek S, Somssich IE (2002)** Targets of *AtWRKY6* regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev.* **16**:1139-1149.
- Robatzek S, Chinchilla D, Boller T (2006)** Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **20**:537-542.
- Robert-Seilantantz A, Navarro L, Bari R, Jones JD (2007)** Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol.* **10**:372-379.
- Rock C (2000)** Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.* **148**:357–396.
- Roeder RG (1996)** The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci.* **21**:327-335.
- Rommens CM, Salmeron JM, Oldroyd GE, Staskawicz BJ (1995)** Intergeneric transfer and functional expression of the tomato disease resistance gene *Pto*. *Plant Cell.* **7**: 1537-1544.
- Roth FP, Hughes JD, Estep PW, Church GM (1998)** Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA quantitation. *Nat Biotechnol.* **16**:939-945.
- Roy AL, Malik S, Meisterernst M, Roeder RG (1993)** An alternative pathway for transcription initiation involving TFIID. *Nature*. **365**:355-359.
- Rushton PJ, Torres JT, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich IE (1996)** Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J.* **15**:5690-5700.
- Rushton PJ, Somssich IE (1998)** Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr Opin Plant Biol.* **1**:311-315.
- Rushton PJ, Reinstädler A, Lipka V, Lippok B, Somssich IE (2002)** Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell.* **14**:749-762.

- Ryan CA, Huffaker A, Yamaguchi Y** (2007) New insights into innate immunity in Arabidopsis. *Cell Microbiol.* **9**:1902-1908.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandelin A, Wasserman WW** (2004) Constrained binding site diversity within families of transcription factors enhances pattern discovery bioinformatics. *J Mol Biol.* **338**:207-215.
- Santi L, Wang Y, Stile MR, Berendzen K, Wanke D, Roig C, Pozzi C, Müller K, Müller J, Rohde W, Salamini F** (2003) The GA octonucleotide repeat binding factor BBR participates in the transcriptional regulation of the homeobox gene *Bkn3*. *Plant J.* **34**:813-820.
- Sato F, Kitajima S, Koyama T, Yamada Y** (1996) Ethylene-induced gene expression of osmotin-like protein, a neutral isoform of tobacco PR-5, is mediated by the AGCCGCC *cis*-sequence. *Plant Cell Physiol.* **37**:249-255.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO** (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* **270**:467-470.
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM** (2000) Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:11655-11660.
- Schiemann E** (1948) Weizen, Roggen, Gerste. Systematik, Geschichte und Verwendung. Engelmann Verlag, Jena.
- Schiermeyer A, Hartenstein H, Mandal MK, Otte B, Wahner V, Schillberg S** (2009) A membrane-bound matrix metalloproteinase from *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 is induced by bacterial pathogens. *BMC Plant Biol.* **9**:83.
- Schindler U, Menkens AE, Beckmann H, Ecker JR, Cashmore AR** (1992) Heterodimerization between light-regulated and ubiquitously expressed *Arabidopsis* GBF bZIP proteins. *EMBO J.* **11**:1261-1273.
- Schöb H, Kunz C, Meins F Jr.** (1997). Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Mol Gen Genet.* **256**:581-585
- Schulze-Lefert P, Dangl JL, Becker-Andre M, Hahlbrock K, Schulz W** (1989) Inducible in vivo DNA footprints define sequences necessary for UV light activation of the parsley chalcone synthase gene. *EMBO J.* **8**:651-656.
- Schulze-Lefert P, Vogel J** (2000) Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends Plant Sci.* **5**:343-8.
- Schwessinger B, Zipfel C** (2008) News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr Opin Plant Biol.* **11**:389-395.

- Sessa G, Yang XQ, Raz V, Eyal Y, Fluhr R** (1995) Dark induction and subcellular localization of the pathogenesis-related PRB-1b protein. *Plant Mol Biol.* **28**:537-547.
- Shah J, Tsui F, Klessig DF** (1997) Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sal1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Mol Plant Microbe Interact.* **10**:69-78.
- Shan L, He P, Li J, Heese A, Peck SC, Nürnberger T, Martin GB, Sheen J** (2008) Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe.* **4**:17-27.
- Shen Q, Ho TH** (1995) Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *Plant Cell.* **7**:295-307.
- Shen Q, Zhang P, Ho TH** (1996) Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell.* **8**:1107-19.
- Shinshi H, Usami S, Ohme-Takagi M** (1995) Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a tobacco class I chitinase gene. *Plant Mol Biol.* **27**:923-32.
- Shiu SH, Bleeker AB** (2001) Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci STKE.* **113**:RE22.
- Shiu SH, Bleeker AB** (2003) Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **132**:530-543.
- Sibéril Y, Doireau P, Gantet P** (2001) Plant bZIP G-box binding factors. Modular structure and activation mechanisms. *Eur J Biochem.* **268**:5655-5666.
- Singh K, Dennis ES, Ellis JG, Llewellyn DJ, Tokuhisa JG, Wahleithner JA, Peacock WJ** (1990) OCSBF-1, a maize ocs enhancer binding factor: isolation and expression during development. *Plant Cell.* **2**:891–903.
- Singh K, Foley RC, Oñate-Sánchez L** (2002) Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr Opin Plant Biol.* **5**:430-436.
- Sitte P, Weiler E, Kadereit JW, Bresinsky A, Körner C** (2002) Lehrbuch der Botanik für Hochschulen, 35. Auflage, Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg.
- Smirnoff N, Grant M** (2008) Plant biology: do DELLAs do defence? *Curr Biol.* **18**:R617-619.
- Solano R, Stepanova A, Chao Q, Ecker JR** (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev.* **12**:3703-3714.

- Somssich IE** (2003) Closing another gap in the plant SAR puzzle. *Cell*. **113**:815-8166.
- Song YH, Yoo CM, Hong AP, Kim SH, Jeong HJ, Shin SY, Kim HJ, Yun DJ, Lim CO, Bahk JD, Lee SY, Nagao RT, Key JL, Hong JC** (2008) DNA-binding study identifies C-box and hybrid C/G-box or C/A-box motifs as high-affinity binding sites for STF1 and LONG HYPOCOTYL5 proteins. *Plant Physiol*. **146**:1862-1877.
- Southern EM, Maskos U, Elder JK** (1992) Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. *Genomics*. **13**:1008-1017.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CM** (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*. **15**:760-770.
- Spoel SH, Johnson JS, Dong X** (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**:18842-7.
- Sprenger-Haussels M, Weisshaar B** (2000). Transactivation properties of parsley proline-rich bZIP transcription factors. *Plant J*. **22**:1-8.
- Stålberg K, Ellerstöm M, Ezcurra I, Ablöv S, Rask L** (1996) Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the *napA* storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds. *Planta*. **199**:515-9.
- Stals H, Inzé D** (2001) When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci*. **6**:359-364.
- Staswick PE** (2008) JAZing up jasmonate signaling. *Trends Plant Sci*. **13**:66-71.
- Steffens NO, Galuschka C, Schindler M, Bülow L, Hehl R** (2004). AthaMap: an online resource for *in silico* transcription factor binding sites in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nucleic Acids Res*. **32**:D368–D372.
- Steffens NO, Galuschka C, Schindler M, Bülow L, Hehl R** (2005) AthaMap web tools for database-assisted identification of combinatorial *cis*-regulatory elements and the display of highly conserved transcription factor binding sites in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res*. **33**:W397-402.
- Stegmaier P, Kel AE, Wingender E** (2004) Systematic DNA-binding domain classification of transcription factors. *Genome Inform*. **15**:276-286.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP** (1997) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*. **35**:235-270.
- Stöcker W, Bode W** (1995) Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr Opin Struct Biol*. **5**:383-390.

- Stone BA, Clarke AE** (1992) Chemistry and biology of 1,3- β -D-glucans. La Trobe University Press, Melbourne.
- Strittmatter G, Janssens J, Opsomer C, Botterman J** (1995) Inhibition of Fungal Disease Development in Plants by Engineering Controlled Cell Death. *Bio/Technology* **13**:1085-1089.
- Strompen G, Grüner R, Pfitzner UM** (1998) An *as-1*-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco. *Plant Mol Biol.* **37**:871-83.
- Tai TH, Dahlbeck D, Clark ET, Gajiwala P, Pasion R, Whalen MC, Stall RE, Staskawicz BJ** (1999) Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:14153-14158.
- Tamagnone L, Merida A, Parr A, Mackay S, Culianez-Macia FA, Roberts K, Martin C** (1998) The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from antirrhinum regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell.* **10**:135-154.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* **24**:1596-1599.
- Tang X, Xie M, Kim YJ, Zhou J, Klessig DF, Martin GB** (1999) Overexpression of Pto activates defense responses and confers broad resistance. *Plant Cell.* **11**:15-29.
- Thatcher LF, Anderson JP, Singh KB** (2005) Plant defence responses: what have we learnt from Arabidopsis? *Funct Plant Biol.* **32**:1-19.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J** (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature.* **448**:661-665.
- Thomas MS, Flavell RB** (1990) Identification of an enhancer element for the endosperm-specific expression of high molecular weight glutenin. *Plant Cell.* **2**:1171-1180.
- Thomas MC, Chiang CM** (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **41**:105-178.
- Ton J, Flors V, Mauch-Mani B** (2009) The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci.* **14**:310-7.
- Torres MA, Jones JD, Dangl JL** (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* **141**:373-378.
- Trémousaygue D, Garnier L, Bardet C, Dabos P, Hervé C, Lescure B** (2003) Internal telomeric repeats and 'TCP domain' protein-binding sites co-operate to regulate gene expression in *Arabidopsis thaliana* cycling cells. *Plant J.* **33**:957-966.

- Truman W, Bennett MH, Kubigsteltig I, Turnbull C, Grant M** (2007) Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**:1075–1080.
- Turck F, Zhou A, Somssich IE** (2004) Stimulus-dependent, promoter-specific binding of transcription factor WRKY1 to its native promoter and the defense-related gene *PcPR1-1* in Parsley. *Plant Cell*. **16**(10):2573-85.
- Turner JG, Ellis C, Devoto A** (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*. **14**:S153-164.
- Ülker B, Somssich IE** (2004) WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol*. **7**:491-498.
- Underwood W, Somerville SC** (2008) Focal accumulation of defences at sites of fungal pathogen attack. *J Exp Bot*. **59**:3501-3508.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**:11632-11637.
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K** (1993) An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell*. **5**:1529-1539.
- van de Löcht U, Meier I, Hahlbrock K, Somssich IE** (1990) A 125 bp promoter fragment is sufficient for strong elicitor-mediated gene activation in parsley. *EMBO J*. **9**:2945-2950.
- van der Fits L, Zhang H, Menke FL, Deneka M, Memelink J** (2000) A *Catharanthus roseus* BPF-1 homologue interacts with an elicitor-responsive region of the secondary metabolite biosynthetic gene *Str* and is induced by elicitor via a JA-independent signal transduction pathway. *Plant Mol Biol*. **44**:675-685.
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CM** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*. **44**:135-162.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW** (1995) Serial analysis of gene expression. *Science*. **270**:484-487.
- Venter J.C, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG et al.** (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**:1304-1351.
- Venter M** (2007) Synthetic promoters: genetic control through cis engineering. *Trends Plant Sci*. **12**:118-124.
- Walley JW, Coughlan S, Hudson ME, Covington MF, Kaspi R, Banu G, Harmer SL, Dehesh K** (2007) Mechanical stress induces biotic and abiotic stress responses via a novel *cis*-element. *PLoS Genet*. **3**:1800-1812.

- Walther D, Brunnemann R, Selbig J** (2007) The regulatory code for transcriptional response diversity and its relation to genome structural properties in *A. thaliana*. *PLoS Genet.* **3**:e11.
- Wang KL, Li H, Ecker JR** (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell.* **14**:S131-151.
- Wang D, Weaver ND, Kesarwani M, Dong X** (2005) Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science.* **308**:1036-1040.
- Wang C-I, Gunčar G, Forwood JK, The T, Catanzariti AM, Lawrence GJ, Loughlin FE, Mackay JP, Schirra HJ, Anderson PA, Ellis JG, Dodds PN, Kobe B** (2007). Crystal Structures of Flax Rust Avirulence Proteins AvrL567-A and -D Reveal Details of the Structural Basis for Flax Disease Resistance Specificity. *Plant Cell.* **19**:2898-2912.
- Washida H, Wu CY, Suzuki A, Yamanouchi U, Akihama T, Harada K, Takaiwa F** (1999) Identification of *cis*-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene *GluB-1*. *Plant Mol Biol.* **40**:1-12.
- Weisshaar B, Armstrong GA, Block A, da Costa e Silva O, Hahlbrock K.** (1991) Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBO J.* **10**:1777-1786.
- Welchen E, Gonzalez DH** (2005) Differential expression of the Arabidopsis cytochrome c genes *Cytc-1* and *Cytc-2*. Evidence for the involvement of TCP-domain protein-binding elements in anther- and meristem-specific expression of the *Cytc-1* gene. *Plant Physiol.* **139**:88-100.
- Welchen E, Gonzalez DH** (2006) Overrepresentation of elements recognized by TCP-domain transcription factors in the upstream regions of nuclear genes encoding components of the mitochondrial oxidative phosphorylation Machinery. *Plant Physiol.* **141**:540-545.
- Williams ME, Foster R, Chua NH** (1992) Sequences flanking the hexameric G-box core CACGTG affect the specificity of protein binding. *Plant Cell.* **4**:485–496.
- Wippich, Fabian** (Bachelorarbeit, 2008). *In-vitro* Konstrukte zur Analyse Pathogen-responsiver *cis*-regulatorischer Elemente in *Arabidopsis thaliana*.
- Wroblewski T, Tomczak A, Micheltore R** (2005). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J.* **3**:259-273.
- Wu C, Washida H, Onodera Y, Harada K, Takaiwa F** (2000) Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal *cis*-element requirements for endosperm-specific gene expression. *Plant J.* **23**:415-421.

- Xiong Y, Liu T, Tian C, Sun S, Li J, Chen M.** (2005) Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots. *Plant Mol Biol.* **59**:191-203.
- Xu X, Chen C, Fan B, Chen Z** (2006) Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell.* **18**:1310-1326.
- Yang Y, Li R, Qi M** (2000). In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J.* **22**:543-551.
- Yanhui C, Xiaoyuan Y, Kun H, Meihua L, Jigang L, Zhaofeng G, Zhiqiang L, Yunfei Z, Xiaoxiao W, Xiaoming Q, Yunping S, Li Z, Xiaohui D, Jingchu L, Xing-Wang D, Zhangliang C, Hongya G, Li-Jia Q** (2006) The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol.* **60**:107-124.
- Young ND** (2000) The genetic architecture of resistance. *Curr Opin Plant Biol.* **3**:285-290.
- Yu D, Chen C, Chen Z** (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell* **13**:1527-1540.
- Zhang T, Liu Y, Yang T, Zhang L, Xu S, Xue L, An L** (2006) Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiol Biochem.* **44**:274-283.
- Zhu YJ, Qiu X, Moore H, Borth W, Hu J, Ferreira S, Albert HH** (2003) Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **63**:237-248.
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G** (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell.* **125**:749-760.
- Zourelidou M, de Torres-Zabala M, Smith C, Bevan MW** (2002) Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression. *Plant J.* **30**:489-497.

7. Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 14: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen.

2,4-D	Dichlorphenoxyessigsäure
4-MU	4-Methylumbelliferyl
A	<i>absent</i>
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ABF	ABRE <i>binding factor</i>
ABRC1	ABA response complex 1
ABRE	ABA response
Acs	1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure Synthase
AGI	Gen-Identifikationsnummer
AGRIS	<i>Arabidopsis gene regulatory information server</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtcisDB	<i>Arabidopsis thaliana cis-regulatory database</i>
AtTFDB	<i>Arabidopsis thaliana transcription factor database</i>
AMP	Antimikrobielles Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
AP2	APETALA 2
AS	Aminosäuren
AS1	Asparagin Synthase 1
ATG	Translationsstart
ATP	Adenosintriphosphat
Avr-Gen	Avirulenz-Gen
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
BAP	6-Benzylaminopurin
BAK1	BRI1-assoziierte Kinase 1
BBR	<i>Barley b recombinant protein</i>
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BELL	BEL1-like (<i>class of homeodomain proteins</i>)
BEST	<i>Binding-Site Estimation Suite of Tools</i>
bHLH	basische Helix-Loop-Helix Proteine
Bkn3	<i>Barley knox 3</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BRI1	<i>Brassinosteroid insensitiv 1</i>
BS	Bindungsstelle/~sequenz
BS1	<i>Binding site 1</i>
BSA	Rinderserumalbumin
BTH	Benzo(1, 2, 3)thiadiazole-7-carbothiosäure-S-Methylester
bZIP	basische Leuzin-Zipper Proteine
C	Celsius
ca.	circa
Ca	Calcium
CaMV	<i>Cauliflower mosaik virus</i>
CC	<i>Coiled-coiled</i>
CCR	Cinnamoyl-CoA Reduktase

CDC	<i>Cell division control protein 6</i>
cDNA	von RNA kopierte DNA (<i>complementary DNA</i>)
CE1	<i>Coupling element 1</i>
CHP	<i>Chapter Datei</i>
CHS	Chalcon Synthase
CIAP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>
cm	Zentimeter
COI	<i>Coronatine insensitive 1</i>
cRNA	<i>in-vitro</i> transkribierte mRNA (<i>complementary RNA</i>)
CTD	Carboxy-terminale Domäne
CTP	Cytidintriphosphat
CYC	<i>Cycloidea</i>
Da	Dalton
DAMP	Gefahr (<i>danger</i>) assoziiertes molekulares Muster
DB	Datenbank
DELLA	Proteindomäne der AS-Consensussequenz Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin-Leucin- Alanin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Bezeichnung einer 1:1:1:1 Mischung der vier Desoxynucleotide Adenosin, Guanosin Cytidin- und Thymidintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpi	<i>Days post inoculation</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. orontii</i>	<i>Erysiphe orontii</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFR	EF-Tu Rezeptor
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu (<i>E. coli</i>)
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
ETI	<i>Effector triggered immunity</i>
EtOH	Ethanol
ETS	<i>Effector triggered susceptibility</i>
ERF	<i>Ethylene response factor</i>
FBP	<i>Family binding profile</i>
Flg22	Flagellin22
FLS2	<i>Flagellin sensitive 2</i>
g	Gramm, Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GA	Gibberellin
GBF	<i>G-box binding factors</i>
GEO	<i>Gene expression omnibus</i>
GG	Gengruppe
Gly2	Glycinin 2
GRA	GT <i>rich activator</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
H ₂ O _{bidest.}	Zweimal destilliertes, steriles Wasser
hpi	<i>Hours post inoculation</i>

HR	Hypersensitive Reaktion
HrpZ	HarpinZ
INA	2,6-Dichlorisonikotinsäure
Inr	Initiations-Element
JA	<i>Jasmonic acid</i> (Jasmonsäure)
JAZ	<i>Jasmonate ZIM-domain</i>
kb	Kilobasenpaare
KJ	Kaliumjodid
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LIP19	<i>Low-temperature-induced protein 19</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRE	Licht-responsives Element
LRR	<i>Leucin Rich Repeat Protein</i>
LTE	Low TRIS-EDTA
LUC	Luziferase
LZ	Leuzin-Zipper
M	Molarität
M	<i>marginal</i>
m	mini
MAMP	Mikroben assoziiertes molekulares Muster
MAPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
MAPKK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase-Kinase
MAPKKK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase
max.	maximal
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
MJ	Methyljasmonat
ml	Milliliter
mm	Millileter
MLIP15	<i>Maize low-temperature-induced protein 15</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Boten Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)
MS	Murashige & Skoog
MUG	Methylumbelliferyl-β-D-Galactosid
MVA	Mevalonsäure
MYC	Myelocytomatose
MYB	Myeloblastosis
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (phosphoryliert)
NASC	<i>Nottingham arabidopsis stock centre</i>
NBS	<i>Nucleotid binding site</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nukleotid-bindende und Oligomerisation Domäne
NPPOC	2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl
NPR1	<i>Non-expressor of pathogenesis-related genes 1</i>

Nr.	Nummer
nt	Nukleotide
NTPs	Bezeichnung einer 1:1:1:1 Mischung der vier Nukleotide Adenosin-, Cytidin- Guanosin- und Thimidintriphosphat
OBF	<i>Ocs-binding factor</i>
OCS	<i>Octopine synthase element</i>
OCSBF-1	<i>Ocs-binding factor-1</i>
O. D.	Optische Dichte
P	<i>present</i>
<i>P. infestans</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PAMP	Pathogen assoziiertes molekulares Muster
PCD	<i>Programmed cell death</i>
PCF	<i>Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) factors</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDF	<i>Plant defensin</i>
PEG	Polyethylenglykol
pH	Negative dekadische Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration
PIF3	<i>Phytochrome interacting factor 3</i>
PLACE	<i>Plant cis-acting regulatory DNA elements</i>
RNase	Ribonuklease A
PP	Protoplasten
PR-Proteine	Pathogenese bezogene Proteine
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PSSM	<i>Position-specific scoring matrix</i>
PTI	<i>PAMP triggered immunity</i>
pto	<i>Pseudomonas syringae pv tomato</i>
pv	<i>pathovar</i>
rab17	<i>response to ABA</i>
R-Gen	Resistenz-Gen
rpm	<i>rounds per minute</i>
R-Protein	Resistenz-Protein
RLK	<i>Receptor Like Kinase</i>
RLP	<i>Receptor Like Protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Pol II	RNA-Polymerase II
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RuBisCo	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase
s.	siehe
SA	Salizylsäure
SAR	Systemisch erworbene Resistenz
SCF	<i>Skip/Cullin/F-box</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SEF4	<i>Soybean embryo factor 4</i>
sog.	so genannten

SORLIP	<i>Sequences over-represented in light induced promoters</i>
SPE	<i>Starch-branching enzyme</i>
STK	<i>Storekeeper</i>
TAFs	TBP-assozierte Faktoren
TAIR	<i>The arabidopsis information resource</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	<i>Teosinte branched 1</i>
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TCP	TB1, CYC, PCF ähnliche Proteine
T-DNA	Transfer-DNA
TE	TRIS-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
TFen	Transkriptionsfaktoren
TF-BS	Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle(n)
TGA	<i>TGACG Motif-Binding Factor</i>
TIR	<i>Toll-like/Interleukin-like-Receptors</i>
TMV	Tabak Mosaik Virus
TRAB1	<i>Transcription factor responsible for ABA regulation 1</i>
TRIS	TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TSS	Transkriptionsstart
TTP	Thymidintriphosphat
U	Unit (Enzymeinheit)
UPRE	<i>Unfolded protein response element</i>
UTR	Nicht translatierte Region
UV	Ultraviolett
VP1	<i>Viviparous 1</i>
WAR	<i>Wounding activating region</i>
x	Multiplikationszeichen, Variable
XBP1	<i>X-box-binding protein 1</i>
z. B.	zum Beispiel

8. Anhang

8.1. Sequenz des pBT10-GUS Vektors

Unterstrichen sind die TATA-Box sowie das Startcodon des GUS-Gens. Die *SpeI*- und die *XbaI*-Schnittstelle sind rot markiert. Die Sequenz ist unter der Adresse www2.mpiz-koeln.mpg.de/~weissaha/BW-research/Vectors.html im Internet verfügbar.

>pBT10-GUS

```
AGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATAT
GTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTAT
TCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCAGG
AACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCT
CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGT
TCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCGCCATACACTA
TTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAG
AGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTGCAGGCAACTTACTTCTGACAAACGATCCG
AGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTTCGCTTGATCGTTGGGA
ACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAAC
GTTGCGCAAACTATTAAGTGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGA
GGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATC
TGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT
CGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGG
TGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGAGCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAA
ACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTA
ACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCCTT
TTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTCGGGA
TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACAGCAGAGCGCAGATACCAAACTGTCTT
TCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCT
AATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATA
GTTACCGGATAAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAAC
GACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAA
GGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAA
CGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTC
GTCAGGGGGGGCGAGCCTATGGAACCAACGCGGCTTTTACGGTTCTTGCCCTTTTGCTG
GCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGA
GTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAAGCAGCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGA
GCGCCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGCAGCGGATCAAGCTTGA
TCCATCGATGAATTCGGCGCGCCACTAGTGCAGTCCCGGCTGCAGTCTAGAGTTCGACCGCAAGACCTTCCTC
TATATAAGGAAGTTTCATTTTCAATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCCACCATGTCCTGTTAGAAA
CCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTGAGTCTGGATCGCGAAAACTGTGGAA
TTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCGCGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCTGTGCCAGGCAGTTTAAACG
ATCAGTTCGCGGATGCAGATATTGTAATTATGCGGGCAACGTCCTGGTATCAGCGCGAAGTCTTTATAC
CGAAAGGTTGGGCAGGCCAGCGTATCGTGCTGCGTTTTGATGCGGTCACTCATTACGGCAAAAGTGTGGG
TCAATAATCAGGAAGTGATGGAGCATCAGGGCGGCTATACGCCATTTGAAGCCGATGTCACGCCGTATG
TTATTGCCGGGAAAAGTGATCGTATACCGTTTTGTGTGAACAACGAACTGAAGTGGCAGACTATCCCGC
CGGAATGGTGATTACCGACGAAAACGGCAAGAAAAAGCAGTCTTACTTCCATGATTTCTTTAACTATG
CCGAATCCATCGCAGCGTAATGCTCTACACCACGCCGAACACCTGGGTGGACGATATCACCCTGGTGA
CGCATGTGCGCAAGACTGTAACCACGCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGGCCAATGGTGATGTCAGCG
TTGAAGTGCCTGATGCGGATCAACAGGTGGTTGCAACTGGACAAGGCACTAGCGGGACTTTGCAAGTGG
TGAATCCGCACCTCTGGCAACCGGGTGAAGGTTATCTCTATGAACTGTGCGTCACAGCCAAAAGCCAGA
CAGAGTGTGATATCTACCGCTTCGCGTCGGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAGTTCCTGA
TTAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTGCCTCATGAAGATGCGGACTTTCGTGGCAAAGGAT
TCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCACGATTAATGGACTGGATTGGGGCCAACCTACCGTACCT
```

CGCATTACCCCTTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGGGCAGATGAACATGGCATCGTGGTGATTGATGAAA
 CTGCTGCTGTGCGGCTTTAACCTCTCTTTAGGCATTGGTTTCGAAGCGGGCAACAAGCCGAAAGAACTGT
 ACAGCGAAGAGGCAGTCAACGGGGAACTCAGCAAGCGCACTTACAGGCGATTAAAGAGCTGATAGCGC
 GTGACAAAAACCACCAAGCGTGGTGATGTGGAGTATTGCCAACGAACCGGATACCCGTCCGCAAGGTG
 CACGGGAATATTTTCGCGCCACTGGCGGAAGCAACGCGTAAACTCGACCCGACGCGTCCGATCACCTGCG
 TCAATGTAATGTTCTGCGACGCTCACACCGATACCATCAGCGATCTCTTTGATGTGCTGTGCCTGAACC
 GTTATTACGGATGGTATGTCCAAAGCGGCGATTGGAACGGCAGAGAAGGTACTGGAAAAAGAACTTC
 TGGCCTGGCAGGAGAACTGCATCAGCCGATTATCATCACCGAATACGGCGTGGATACGTTAGCCGGGC
 TGCACCTCAATGTACACCGACATGTGGAGTGAAGAGTATCAGTGTGCATGGCTGGATATGTATCACCGCG
 TCTTTGATCGCGTCAGCGCCGTCGTCGGTGAACAGGTATGGAATTCGCCGATTTTTCGACCTCGCAAG
 GCATATTGCGCGTTGGCGGTAACAAGAAAGGGATCTTCACTCGCGACCGCAAACCGAAGTCGGCGGCTT
 TTCTGCTGCAAAACGCTGGACTGGCATGAACTTCGGTGAAAAACCGCAGCAGGGAGGCAAAACATGAA
 TCAACAACCTCTCCTGGCGCACCATCGTCGGCTACAGCCTCGGGAATTGCTACCGAGCTCCCGGGTACCT
 GATCATGAGTAATTAGCTCGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAAGATTGA
 ATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTA
 ACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAAT
 ACGCGATAGAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTAC
 TAGATCGGGAATTAGATCTGCTAGC

8.2. Sequenz des pBT10-LUC Vektors

Unterstrichen sind die TATA-Box sowie das Startcodon des GUS-Gens. Die *SpeI*- und die *XbaI*-Schnittstelle sind rot markiert. Die Sequenz wurde von Dietmar Stahl (persönliche Mitteilung) zur Verfügung gestellt.

>pBT10-LUC

AGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATAT
 GTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTAT
 TCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGA
 AACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCT
 CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGT
 TCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTA
 TTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAG
 AGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG
 AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGA
 ACCGGAGCTGAATGAAGCATAACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACG
 TTGCGCAAACTATTAACTGGCGAATACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAG
 GCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGTTTATTGCTGATAAACTCT
 GGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATC
 GTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGT
 GCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAA
 CTTTCAATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAA
 CGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTT
 TTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGAT
 CAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTT
 CTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTA
 ATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAG
 TTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAAGC
 ACCTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAG
 GCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAAC
 GCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCG
 TCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTTCTGGCCTTTTGTCTGG
 CCTTTTGCTACATGTTCTTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAG
 TGAGCTGATAACCGCTCGCCGACCGGAACGACGAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAG
 CGCCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCCGCGCGCTTGCGCGATTTCATTAAATGCATGCAAGCTTGGAT
 CCATCGATGAATTGCGCGCGCCTACTAGTGCCGGCCTGCAGTCTAGAGTCTGACCGCAAGACCCCTTCTCT

ATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCCACC**ATG**GGAAGACGCCAAAAACAT
AAAGAAAGGCCCGGCCGCGCCATTCTATCCTCTTGAGGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTAT
GAAGAGATACGCCCTGGTTCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGAACATCACGTA
CGCGGAATACTTCGAAATGTTTCGTTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCA
CAGAATCGTCGTATGCAGTGAAACTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATCGG
AGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGAACATTTTCGCA
GCCTACCGTAGTGTGTTTCCAAAAAGGGTTGCAAAAAATTTGAACGTGCAAAAAAATTACCAAT
AATCCAGAAAATTATTATCATGGATTCTAAACGGATTACCAGGGATTTCAGTCGATGTACACGTTTCGT
CACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTACCAGAGTCCTTTGATCGTGACAAAAC
AATTGCACTGATAATGAACCTCTCTGGATCTACTGGGTTACCTAAGGGTGTGGCCCTTCCGCATAGAAC
TGCCTGCGTCAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTGGCAATCAAATCATTCGGGATCTGCGAT
TTTAAGTGTTGTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATT
TCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTTTACGATCCCTTCAGGATTACAAAATTCA
AAGTGCGTTGCTAGTACCAACCCTATTTTCATTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTT
ATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGGGGCGCACCTCTTTCGAAAGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCAAA
ACGCTTCCATCTTCCAGGGATACGACAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTAC
ACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTTCGTAAGTTGTTCCATTTTGAAGCGAAGGTTGTGGA
TCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAGAGAGGCGAATTATGTGTCAGAGGACCTATGATTAT
GTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGG
AGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATAGTTGACCGCTTGAAGTCCTTTAATTAAATA
CAAAGGATATCAGGTGGCCCCCGCTGAATTGGAATCGATATTGTTTACAACACCCCAACATCTTCGACGC
GGGCGTGGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCCGCTTGTGTTTGGAGCACGG
AAAGACGATGACGGAAGAGATCGTGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCG
CGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAAATCAG
AGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTCCAAATTGTAATACCGAGCTCCCGGGTACCTGAT
CATGAGTAAATTAGCTCGAATTTCCCGCATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATC
CTGTTGCCGGTCTTGGCATGATTATCATATAATTTCTGTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACA
TGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACG
CGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG
ATCGGGAATTAGATCTGCTAGC

8.3. Liste der erstellten DNA-Konstrukte und verwendeten Oligonukleotide

Tabelle 15: Liste der erstellten DNA-Konstrukte und verwendeten Oligonukleotide.
Spalte 1 zeigt die DNA-Nummer, Spalte 2 die dazugehörige Glycerinnummer des E. coli
Stammes bzw. des Agrobakterienstammes an. Spalte 4 gibt den Namen oder die
Bezeichnung wieder. Spalte 5 zeigt die Verweise auf die entsprechenden Kapitel.

DNA-Nr.	Glycerin-Kultur		Name/ Beschreibung	Kapitel
	E. coli	A. tumefaciens		
# 4625			Primer GUS_75<	2.1.10.; 2.3.
# 4626			Primer MS23_Insert_left	2.1.10.; 2.3.
# 4627			Primer MS23_Insert_right	2.1.10.; 2.3.
# 4644			Oligonukleotid 3C_M1_S1_1	2.1.10.; 2.3.
# 4645			Oligonukleotid 3C_M1_S1_2	2.1.10.; 2.3.
# 4654			Oligonukleotid 12c_M1_S1_1	2.1.10.; 2.3.
# 4655			Oligonukleotid 12c_M1_S1_2	2.1.10.; 2.3.
# 4638			Oligonukleotid 12EE_M1_S1_1	2.1.10.; 2.3.
# 4639			Oligonukleotid 12EE_M1_S1_2	2.1.10.; 2.3.
# 4640			Oligonukleotid 12EE_M1_S2_1	2.1.10.; 2.3.
# 4641			Oligonukleotid 12EE_M1_S2_2	2.1.10.; 2.3.
# 4656			Oligonukleotid 12r_M1_S1_1	2.1.10.; 2.3.
# 4657			Oligonukleotid 12r_M1_S1_2	2.1.10.; 2.3.
# 4628			Oligonukleotid 15AAA_M1_S1_1	2.1.10.; 2.3.
# 4629			Oligonukleotid 15AAA_M1_S1_2	2.1.10.; 2.3.
# 4634			Oligonukleotid 15CCC_M1_S1_1	2.1.10.; 2.3.
# 4635			Oligonukleotid 15CCC_M1_S1_2	2.1.10.; 2.3.

# 4646			Oligonukleotid 18H_M2_S1_1	2.1.10.; 2.3.
# 4647			Oligonukleotid 18H_M2_S1_2	2.1.10.; 2.3.
# 4636			Oligonukleotid 20a_M1_S1_1	2.1.10.; 2.3.
# 4637			Oligonukleotid 20a_M1_S1_2	2.1.10.; 2.3.
# 4648			Oligonukleotid 21S_M1_S1_1	2.1.10.; 2.3.
# 4649			Oligonukleotid 21S_M1_S1_2	2.1.10.; 2.3.
# 4605			Oligonukleotid 22AAA_M1_S1_1	2.1.10.; 2.3.
# 4606			Oligonukleotid 22AAA_M1_S1_2	2.1.10.; 2.3.
# 4603			Oligonukleotid 24F_M1_S1_1	2.1.10.; 2.3.
# 4604			Oligonukleotid 24F_M1_S1_2	2.1.10.; 2.3.
# 4642			Oligonukleotid 30A-8_M1_S1_1	2.1.10.; 2.3.
# 4643			Oligonukleotid 30A-8_M1_S1_2	2.1.10.; 2.3.
# 4630			Oligonukleotid 30I-8_M1_S1_1	2.1.10.; 2.3.
# 4631			Oligonukleotid 30I-8_M1_S1_2	2.1.10.; 2.3.
# 4632			Oligonukleotid 30I8_M1_S2_1	2.1.10.; 2.3.
# 4633			Oligonukleotid 30I8_M1_S2_2	2.1.10.; 2.3.
# 4652			Oligonukleotid 37C_M1_S1_1	2.1.10.; 2.3.
# 4653			Oligonukleotid 37C_M1_S1_2	2.1.10.; 2.3.
# 4650			Oligonukleotid 37E_M1_S1_1	2.1.10.; 2.3.
# 4651			Oligonukleotid 37E_M1_S1_2	2.1.10.; 2.3.
# 4810			Primer MS_23_left_HindIII_new	2.1.10.; 2.3.
# 4811			Primer MS_23_right_BamHI	2.1.10.; 2.3.
# 4816			Primer pBIN_left	2.1.10.; 2.3.
# 4817			Primer pBIN_right	2.1.10.; 2.3.
# 4914	# 3173		TATA-pBT10-GUS	2.1.9.; 2.3.; 3.12.
# 4916	# 3279		2xS_2xD-pBT10-GUS	2.1.9.; 2.3.; 3.12.
# 4917	# 3280		2xS_2xD-pBT10-LUC	2.1.9.; 3.15.
# 4918	# 3281		2xS_2xD-pBT10-LUC	2.1.9.; 3.15.
# 4919	# 3282		2xD-pBT10-LUC	2.1.9.; 3.15.
# 4920	# 3283		4xD-pBT10-LUC	2.1.9.; 3.15.
# 4921	# 3284		4x18H_M2_S1-pBT10-LUC	2.1.9.; 3.15.
# 4922	# 3285		2xD_2x18H_M2_S1-pBT10-LUC	2.1.9.; 3.15.
# 4923	# 3286		2xD_4x18H_M2_S1-pBT10-LUC	2.1.9.; 3.15.
# 4924	# 3287		Monomer 3C_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4928	# 3291		Dimer 3C_M1_S1 in pBT-10GUS	2.3.
# 4931	# 3166		Tetramer 3C_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.
# 4934	# 3296		Monomer 12c_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4936	# 3298		Dimer 12c_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4939	# 3167		Tetramer 12c_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.
# 4675	# 3077		Monomer 12EE_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4668	# 3085		Dimer 12EE_M1_S1 in pBT-10GUS	2.3.
# 4674	# 3093		Tetramer 12EE_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.
# 4678	# 3078		Monomer 12EE_M1_S2 in pBT10-GUS	2.3.
# 4664	# 3086		Dimer 12EE_M1_S2 in pBT10-GUS	2.3.
# 4676	# 3094		Tetramer 12EE_M1_S2 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.
# 4944	# 3305		Monomer 12r_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4948	# 3309		Dimer 12r_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4949	# 3168		Tetramer 12r_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.; 3.13.
# 4673	# 3072		Monomer 15AAA_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4670	# 3080		Dimer 15AAA_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4671	# 3088		Tetramer 15AAA_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.
# 4680	# 3075		Monomer 15CCC_M1_S2 in pBT10-GUS	2.3.

# 4662	# 3083		Dimer 15CCC_M1_S2 in pBT10-GUS	2.3.
# 4606	# 3091		Tetramer 15CCC_M1_S2 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.
# 4953	# 3313		Monomer 18H_M2_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4954	# 3314		Dimer 18H_M2_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4958	# 3169		Tetramer 18H_M2_S1 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.; 3.13.
# 4960	# 3319		Oktamer 18H_M2_S1 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.
# 4660	# 3076		Monomer 20a_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4663	# 3084		Dimer 20a_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4672	# 3092		Tetramer 20a_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.
# 4961	# 3320		Monomer 21S_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4963	# 3322		Dimer 21S_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4968	# 3170		Tetramer 21S_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.
# 4699	# 3102		Monomer 22AAA_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4700	# 3103		Dimer 22AAA_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4701	# 3104		Tetramer 22AAA_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.
# 4609	# 3060		Monomer 24F_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4613	# 3064		Dimer 24F_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4615	# 3066		Tetramer 24F_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.
# 4679	# 3079		Monomer 30A-8_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4669	# 3087		Dimer 30A-8_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4683	# 3095		Tetramer 30A-8_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.
# 4658	# 3073		Monomer 30I-8_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4667	# 3081		Dimer 30I-8_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4665	# 3089		Tetramer 30I-8_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.; 3.13.
# 4661	# 3074		Monomer 30I-8_M1_S2 in pBT10-GUS	2.3.
# 4681	# 3082		Dimer 30I-8_M1_S2 in pBT10-GUS	2.3.
# 4682	# 3090		Tetramer 30I-8_M1_S2 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.; 3.13.
# 4970	# 3328		Monomer 37C_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4975	# 3333		Dimer 37C_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4979	# 3171		Tetramer 37C_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.
# 4980	# 3337		Monomer 37E_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4983	# 3340		Dimer 37E_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.
# 4984	# 3172		Tetramer 37E_M1_S1 in pBT10-GUS	2.3.; 3.12.
# 4804	# 3105	# 3106	pBIN-GUSintron-sbA-Vir G726-pm (35S))	2.1.9.; 2.6.; 3.14.
# 4824	# 3174	# 3209	pBIN-GUSintron-TATA-GUS	2.6.; 3.14.
# 4825	# 3175	# 3192	Tetramer 3C_M1_S1 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.
# 4826	# 3176	# 3193	Tetramer 12c_M1_S1 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.
# 4827	# 3177	# 3194	Tetramer 12EE_M1_S1 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.
# 4828	# 3178	# 3195	Tetramer 12EE_M1_S2 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.
# 4829	# 3179	# 3196	Tetramer 12r_M1_S1 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.
# 4830	# 3180	# 3197	Tetramer 15AAA_M1_S1 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.
# 4831	# 3181	# 3198	Tetramer 15CCC_M1_S1 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.
# 4832	# 3182	# 3199	Tetramer 18H_M2_S1 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.
# 4833	# 3183	# 3200	Tetramer 20a_M1_S1 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.
# 4834	# 3184	# 3201	Tetramer 21S_M1_S1 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.
# 4835	# 3185	# 3202	Tetramer 22AAA_M1_S1 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.
# 4836	# 3186	# 3203	Tetramer 24F_M1_S1 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.
# 4837	# 3187	# 3204	Tetramer 30A-8_M1_S1 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.
# 4838	# 3188	# 3205	Tetramer 30I-8_M1_S1 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.
# 4839	# 3189	# 3206	Tetramer 30I-8_M1_S2 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.
# 4840	# 3190	# 3207	Tetramer 37C_M1_S1 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.
# 4841	# 3191	# 3208	Tetramer 37D_M1_S1 in pBIN-GUS	2.6.; 3.14.

8.4. Sequenzierungsergebnisse

Im folgendem sind die Ergebnisse der Sequenzierungen der positiv getesteten Elemente mit dem Primer GUS_75< gezeigt. Unterstrichen ist die klonierte Einzelsequenz der entsprechenden Motive, rot markiert sind die *SpeI*- und die *XbaI*-Schnittstelle.

>3C_M1_s1

TTTCATTAATGCAGCGGATCAAGCTTGGATCCATCGATGAATTCGGCGCGCCACTAGTTTTGATACGGT
TACGGTTAATTAACGTCTAGTTTTGATACGGTTACGGTTAATTAACGTCTAGTTTTGATACGGTTACGG
TTAATTAACGTCTAGTTTTGATACGGTTACGGTTAATTAACGTCTAGAGTCGACCGCAAGACCCCTTCCT
CTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCCACCATGGTCCGTCCTGTAGAA
ACCCCAACCCGTGAAATCAAAAAACCGACGGCCTGGCC

>12c_M1_s1

TTTCATTAATGCAGCGGATCAAGCTTGGATCCATCGATGAATTCGGCGCGCCACTAGTTCTACTAGAGGC
CCATTAGGACCGGCATTCTAGTTCTACTAGAGGCCATTAGGACCGGCATTCTAGTTCTACTAGAGGCC
CATTAGGACCGGCATTCTAGTTCTACTAGAGGCCATTAGGACCGGCATTCTAGAGTCGACCGCAAGAC
CCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCCACCATGGTCCGTC
TG TAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAAACTCGACGGCCTGGA

>12EE_M1_s1

TTTCATTAATGCAGCGGATCAAGCTTGGATCCATCGATGAATTCGGCGCGCCACTAGTTAGGTTCCCTGC
CCTCTCCGTTCCCTCCTCTAGTTAGGTTCCCTGCCCTCTCCGTTCCCTCCTCTAGTTAGGTTCCCTGCCCTCT
CCGTTCCCTCCTCTAGTTAGGTTCCCTGCCCTCTCCGTTCCCTCCTTCTAGAGTCGACCGCAAGACCCCTTCCT
CTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCCACCATGGTCCGTCCTGTAGAA
ACCCCAACCCGTGAAATCAAAAAACTCGACGGCCATGA

>12EE_M1_s2

TTTAATGCAGCGGATCAAGCTTGGATCCATCGATGAATTCGGCGCGCCACTAGTTCGAAACCAACCCCTC
TCCCTTATAAATCTAGTTTCGAAACCAACCCCTCTCCCTTATAAATCTAGTTTCGAAACCAACCCCTCTCCCT
TATAAATCTAGTTTCGAAACCAACCCCTCTCCCTTATAAATCTAGAGTCGACCGCAAGACCCCTTCCTCTAT
ATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCCACCATGGTCCGTCCTGTAGAAACCC
CAACCCGGAAATCAAAAAACTCGACGGCCAAAA

>12r_M1_s1

TTCATTAATGCAGCGGATCAAGCTTGGATCCATCGATGAATTCGGCGCGCCACTAGTCAATCTACTCGT
CTCTTCTCTTACATTCTAGTCAATCTACTCGTCTCTTCTCTTACATTCTAGTCAATCTACTCGTCTCTT
CTCTTACATTCTAGTCAATCTACTCGTCTCTTCTCTTACATTCTAGAGTCGACCGCAAGACCCCTTCCTC
TATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTCGAGGGCCACCATGGTCCGTCCTGTAGAAAC
CCCAACCCGTGAAATCAAAAAATCGACGGCTGGCAG

>15AAA_M1_s1

TTCATTAATGCAGCGGATCAAGCTTGGATCCATCGATGAATTCGGCGCGCCACTAGTGACTTTTGACCT
AAACCATTTCATTCTAGTGACTTTTGACCTAAACCATTTCATTCTAGTGACTTTTGACCTAAACCAT
TTCCATTCTAGTGACTTTTGACCTAAACCATTTCATTCTAGAGTCGACCGCAAGACCCCTTCCTCTATA
TAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCCACCATGGTCCGTCCTGTAGAAACCC
AACCCGTGAAATCAAAAAATCGACGGCTTGACC

>15CCC_M1_S1

TTCATTTAATGCAGCGGATCAAGCTTGGATCCATCGATGAATTCGGCGCGCCACTAGTTCACACACGTGT
ACTAGGTCAAACCATCTAGTCACACACGTGTACTAGGTCAAACCATCTAGTCACACACGTGTACTAGGT
CAAACCATCTAGTCACACACGTGTACTAGGTCAAACCATCTAGTGTGCGACCGCAAGACCCCTTCCCTCTAT
ATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCCACCATGGTCCGTCTCTGTAGAAACCC
CAACCCGTGAAATCAAAAACTCGACGGCCTGGA

>18H_M2_S1

GAGGGACCGAGCGCAGGGAGTCAGTGAGCGAGGGGAGCGGAAGAGGGGCCAATACGCAATCCGCCTCT
CCCCGTGGGTGGATGTGCGTTACTGCAGCGGATCAAGCTTGGATCCATCGATGAATTCGGCGCGCCACT
AGTCAACACAAAACGCAAACGCAGACCTCTCTAGTCAACACAAAACGCAAACGCAGACCTCTCTAGTCA
ACACAAAACGCAAACGCAGACCTCTCTAGTCAACACAAAACGCAAACGCAGACCTCTCTAGTCA
GCAAGACCCCTTCCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCCACCACGG
TCCGTCTCTGTAGAAACCCCAACCGCTCAAATCAAAAAATCGACGGCTCGCA

>20a_M1_S1

CGGATCAAGCTTGGATCCATCGATGAATTCGGCGCGCCACTAGTTTAGAAGTGGCTCGAGTGTCTACT
TTCTAGTTTAGAAGTGGCTCGAGTGTCTACTTTCTAGTTTAGAAGTGGCTCGAGTGTCTACTTTCTA
GTTTAGAAGTGGCTCGAGTGTCTACTTTCTAGTGTGCGACCGCAAGACCCCTTCCCTCTATATAAGGAAGT
TCATTTTCAATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCCACCATGGTCCGTCTCTGTAGAAACCCCAACCCGTGA
AATCAAAAAATC

>21S_M1_S1

GAGCGGCCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGGAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCC
CCGTGGGTTGGTTTTTTTCAATTTAATGCAGCGGATCAAGCTTGGATCCATCGATGAATTCGGCGCGCCAC
TAGTAAGCGATGTTTACGAACCCCAAAATCTCTAGTAAGCGATGTTTACGAACCCCAAAATCTCTAGTA
AGCGATGTTTACGAACCCCAAAATCTCTAGTAAGCGATGTTTACGAACCCCAAAATCTCTAGTA
CCGCAAGACCCCTTCCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCCACCAT
GGTCCGTCTCTGTAGAAACCCCAACCGCTCAAATCAAAAAATCGACCGCTCGAGG

>22AAA_M1_S1

AAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGCAGCGGATCAAGCT
TGGATCCATCGATGAATTCGGCGCGCCACTAGTTTTTTCTCGTCCCCATCCTCTATCCTCTAGTTTTTT
CTCGTCCCCATCCTCTATCCTCTAGTTTTTTCTCGTCCCCATCCTCTATCCTCTAGTTTTTTCTCGTCC
CCATCCTCTATCCTCTAGTGTGCGACCGCAAGACCCCTTCCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAG
AGGACA

24F_M1_S1

TTCATTAATGCAGCGGATCAAGCTTGGATCCATCGATGAATTCGGCGCGCCACTAGTTCATCAATGTGA
CATAAGCAAAGCTTCTAGTTCATCAATGTGACATAAGCAAAGCTTCTAGTTCATCAATGTGACATAAGC
AAAGCTTCTAGTTCATCAATGTGACATAAGCAAAGCTTCTAGTTCATCAATGTGACATAAGC
TAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCCACCATGGTCCGTCTCTGTAGAAACCC
AACCCGTGAAATCAAAAAATCGACGGCCTGGGA

>30A-8_M1_S1

TTTCATTATGCAGCGGATCAAGCTTGGATCCATCGATGAATTCGGCGCGCCACTAGTGCAAACCTAACGC
CGGCGGCCGTCTTGTCTAGTGCAAACCTAACGCCGGCGGCCGTCTTGTCTAGTGCAAACCTAACGCCGGCG
GCCGTCTTGTCTAGTGCAAACCTAACGCCGGCGGCCGTCTTGTCTAGTGCAAACCTAACGCCGGCG
TATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCCACCATGGTCCGTCTCTGTAGAAA
CCCCAACCCGTGAAATCAAAAAACCGACGGCCTGGG

>30I-8_M1_S1

TTAATGCAGCGGATCAAGCTTGGATCCATCGATGAATTCGGCGCGCCACTAGTACAACAGACGACTTTT
CATAATTCATCTAGTACAACAGACGACTTTTCATAATTCATCTAGTACAACAGACGACTTTTCATAATT
CATCTAGTACAACAGACGACTTTTCATAATTCATCTAGTACAACAGACGACTTTTCATAATT
GAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCCACCATGGTCCGTCTCTGTAGAAACCCCAACC
CGTGAATCAAAAACTCGACGGCCTGG

>30I-8_M1_S2

TTTCATTATGCAGCGGATCAAGCTTGGATCCATCGATGAATTCGGCGCGCCACTAGTCTATATGACAAA
 AGTCAAACATAAATCTAGTCTATATGACAAAAGTCAAACATAAATCTAGTCTATATGACAAAAGTCAA
 CATAAATCTAGTCTATATGACAAAAGTCAAACATAAATCTAGTCTATATGACAAAAGTCAA
 TAAGGAAGTTCAATTTCAATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCCACCATGGTCCGTCTGTAGAAACCCC
 AACCCGTGAAAACAAAAAATCGACGGCTGGTA

>37C_M1_S1

CTGCTGCTTGCAAACCAAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAA
 CTCTTTTTTCCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCG
 TAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCA
 GTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAG
 GCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAA
 CTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTAT
 CCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCTGGTATCTT
 TATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGG
 AGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTCTAC
 ATGTTCTTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACC
 GCTCGCCGCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGC
 AAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGTGGATCAAGCTTGGATCCATCGATGAAT
 TCGGCGCGCCACTAGTAGAAAAATATTGGGCCTACTGGGAATCTAGTAGAAAAATATTGGGCCTACTGG
 GAATCTAGTAGAAAAATATTGGGCCTACTGGGAATCTAGTAGAAAAATATTGGGCCTACTGGGAATCTA
 GAGTCGACCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCAATTTCAATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGG
 CCACCATGGTCCGTCTGTAGAAACCCCAACCCGGAATCA

>37E_M1_S1

TTCATTTAATGCAGCGGATCAAGCTTGGATCCATCGATGAATTCGGCGCGCCACTAGTCGATAAACTTG
 CGAAACCCTAAAATCTAGTCGATAAACTTGCGAAACCCTAAAATCTAGTCGATAAACTTGCGAAACCCT
 AAAATCTAGTCGATAAACTTGCGAAACCCTAAAATCTAGTCGATAAACTTGCGAAACCCT
 GGAAGTTCAATTTCAATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCCACCATGGTCCGTCTGTAGAAACCCCAAC
 CCGTGAAATCAAAAAATCGACGGCCGTGCT

8.5. Ergebnisse der β -Glucuronidase-Reporterassays

Tabelle 16: Ergebnisse aller Einzelexperimente für die Negativkontrolle (TATA-GUS), die Positivkontrolle 2xS_2xD und die tetramerisierten 17 Einzelsequenzen, welche im pBT10-GUS-Vektor vorlagen. Spalte 1 gibt die Bezeichnung der Konstrukte wieder, die Spalte 2 beinhaltet die Produktsätze 4-MU in pmol/(min*mg) ohne PAMP (Pep25), sowie die Spalte 3 die entsprechenden Werte für den Ansatz mit PAMP (Pep25).

Bezeichnung	pmol 4-MU/(min*mg) Ansatz ohne Pep25 Zugabe	pmol 4-MU/(min*mg) Ansatz mit Pep25 Zugabe
TATA-GUS	10,41	2,42
TATA-GUS	15,74	0,00
TATA-GUS	9,88	9,87
TATA-GUS	17,91	12,30
TATA-GUS	9,80	8,64
TATA-GUS	10,15	0,00
TATA-GUS	16,02	13,45
TATA-GUS	21,59	0,23
TATA-GUS	23,62	33,49
TATA-GUS	11,79	6,91
TATA-GUS	5,55	0,00
TATA-GUS	4,89	3,42

TATA-GUS	16,60	9,08
TATA-GUS	12,49	19,36
TATA-GUS	1,24	15,59
2xS_2xD	31,94	943,38
2xS_2xD	122,33	162,84
2xS_2xD	32,21	435,20
2xS_2xD	20,05	126,39
2xS_2xD	17,16	24,40
2xS_2xD	10,50	118,22
2xS_2xD	115,71	178,66
2xS_2xD	21,42	91,31
2xS_2xD	32,94	411,07
2xS_2xD	36,18	261,55
2xS_2xD	20,27	285,48
2xS_2xD	56,92	878,45
2xS_2xD	39,35	244,22
2xS_2xD	68,81	457,50
2xS_2xD	24,32	175,71
2xS_2xD	43,32	1162,64
2xS_2xD	97,90	766,69
2xS_2xD	86,99	1596,02
2xS_2xD	16,54	97,75
2xS_2xD	84,12	396,43
4x3C_M1_S1	42,74	22,24
4x3C_M1_S1	39,71	35,25
4x3C_M1_S1	41,65	25,74
4x3C_M1_S1	33,08	31,28
4x3C_M1_S1	14,19	0,00
4x3C_M1_S1	0,27	9,15
4x3C_M1_S1	49,25	20,31
4x3C_M1_S1	47,21	54,84
4x12c_M1_S1	13,84	6,39
4x12c_M1_S1	32,73	20,73
4x12c_M1_S1	28,54	6,56
4x12c_M1_S1	40,52	26,33
4x12c_M1_S1	27,36	27,14
4x12c_M1_S1	14,52	17,34
4x12EE_M1_S1	1,13	0,00
4x12EE_M1_S1	0,00	0,00
4x12EE_M1_S1	2,93	9,24
4x12EE_M1_S1	7,67	8,96
4x12EE_M1_S2	9,73	0,00
4x12EE_M1_S2	18,32	6,45
4x12EE_M1_S2	18,03	16,85
4x12EE_M1_S2	8,84	7,84
4x12r_M1_S1	25,88	26,93
4x12r_M1_S1	22,02	19,79
4x12r_M1_S1	9,14	0,00
4x12r_M1_S1	13,83	14,02
4x12r_M1_S1	19,55	30,09
4x12r_M1_S1	9,71	1,88
4x15AAA_M1_S1	32,83	73,35

4x15AAA_M1_S1	27,73	97,10
4x15AAA_M1_S1	6,85	31,22
4x15AAA_M1_S1	11,22	59,71
4x15AAA_M1_S1	27,28	48,96
4x15AAA_M1_S1	23,06	51,73
4x15CCC_M1_S1	4,98	25,70
4x15CCC_M1_S1	48,69	6,70
4x15CCC_M1_S1	0,00	16,19
4x15CCC_M1_S1	6,20	51,23
4x15CCC_M1_S1	28,42	21,57
4x15CCC_M1_S1	10,01	0,00
4x18H_M2_S1	108,61	1697,84
4x18H_M2_S1	102,72	819,07
4x18H_M2_S1	60,04	835,43
4x18H_M2_S1	55,28	690,31
4x18H_M2_S1	91,53	1965,83
4x18H_M2_S1	89,97	1393,24
4x18H_M2_S1	17,88	800,67
4x18H_M2_S1	90,52	905,33
4x20a_M1_S1	23,61	0,00
4x20a_M1_S1	11,40	0,00
4x20a_M1_S1	26,95	11,90
4x20a_M1_S1	4,66	0,00
4x21S_M1_S1	18,59	13,16
4x21S_M1_S1	27,26	12,82
4x21S_M1_S1	9,32	3,75
4x21S_M1_S1	14,10	13,60
4x21S_M1_S1	21,25	9,09
4x21S_M1_S1	27,69	3,87
4x22AAA_M1_S1	10,46	2,66
4x22AAA_M1_S1	16,32	15,89
4x22AAA_M1_S1	13,68	0,00
4x22AAA_M1_S1	0,00	2,85
4x22AAA_M1_S1	16,01	28,08
4x22AAA_M1_S1	20,99	18,77
4x22AAA_M1_S1	5,20	0,00
4x22AAA_M1_S1	6,49	0,00
4x24F_M1_S1	13,20	18,83
4x24F_M1_S1	6,32	7,51
4x24F_M1_S1	14,27	11,53
4x24F_M1_S1	5,14	9,79
4x24F_M1_S1	9,74	54,31
4x24F_M1_S1	13,52	19,77
4x30A-8_M1_S1	29,28	50,45
4x30A-8_M1_S1	34,61	0,00
4x30A-8_M1_S1	0,00	13,17
4x30A-8_M1_S1	16,06	3,71
4x30I-8_M1_S1	62,36	20,24
4x30I-8_M1_S1	40,13	48,86
4x30I-8_M1_S1	28,67	46,83
4x30I-8_M1_S1	32,67	41,61
4x30I-8_M1_S2	48,49	153,69

4x30I-8_M1_S2	70,29	151,93
4x30I-8_M1_S2	29,81	53,00
4x30I-8_M1_S2	19,86	57,44
4x30I-8_M1_S2	34,96	63,36
4x30I-8_M1_S2	39,41	47,01
4x37C_M1_S1	16,03	8,07
4x37C_M1_S1	15,55	15,82
4x37C_M1_S1	20,86	0,00
4x37C_M1_S1	3,40	1,76
4x37C_M1_S1	0,00	6,49
4x37C_M1_S1	13,65	10,36
4x37C_M1_S1	11,47	10,61
4x37C_M1_S1	16,59	0,00
4x37E_M1_S1	10,63	2,81
4x37E_M1_S1	11,95	0,00
4x37E_M1_S1	21,83	12,72
4x37E_M1_S1	19,42	9,74
4x37E_M1_S1	12,96	21,62
4x37E_M1_S1	11,57	15,48

Tabelle 17: Ergebnisse der Mittelwerte aller Experimente für die Negativkontrolle (TATA-GUS), die Positivkontrolle 2xS_2xD und die tetramerisierten 17 Einzelsequenzen, welche im pBT10-GUS-Vektor vorlagen. Spalte 1 gibt die Bezeichnung der Konstrukte wieder, die Spalte 2 beinhaltet die Produktsätze 4-MU in pmol/(min*mg) ohne PAMP (Pep25), sowie die Spalte 4 die Standardabweichung der Werte. Spalte 5 gibt die entsprechenden Werte in pmol 4-MU/(min*mg) mit PAMP (Pep25), sowie die Spalte 6 die Standardabweichung der Werte wieder.

Bezeichnung Einzelsequenz	pmol 4-MU / (min*mg) ohne Pep25 Zugabe	STABW	pmol 4-MU / (min*mg) mit Pep25 Zugabe	STABW
TATA-GUS	12,51	6,17	8,98	9,18
2xS_2xD	48,95	34,83	440,70	419,04
4x3C_M1_S1	33,51	17,34	24,85	16,65
4x 12c_M1_S1	26,25	10,43	17,41	9,21
4x 12EE_M1_S1	2,93	3,38	4,55	5,25
4x 12EE_M1_S2	13,73	5,14	7,78	6,94
4x 12r_M1_S1	16,69	6,86	15,45	12,57
4x 15AAA_M1_S1	21,49	10,23	60,34	22,68
4x 15CCC_M1_S1	16,38	18,61	20,23	17,90
4x 18H_M2_S1	77,07	30,42	1138,47	481,88
4x 20a_M1_S1	16,66	10,42	2,98	5,95
4x 21S_M1_S1	19,70	7,26	9,38	4,61
4x 22AAA_M1_S1	11,14	6,92	8,53	10,87
4x 24F_M1_S1	10,37	3,93	20,29	17,38
4x 30A-8_M1_S1	19,99	15,44	16,83	23,09
4x 30I-8_M1_S1	40,95	15,04	39,39	13,12
4x 30I-8_M1_S2	40,47	17,46	87,74	50,69
4x 37C_M1_S1	12,19	7,06	6,64	5,44
4x 37E_M1_S1	14,73	4,69	10,40	8,04

8.6. Ergebnisse der Luziferase-Reportergenassays

Tabelle 18: Ergebnisse aller Einzelerperimente für die Negativkontrolle (TATA-LUC), die Positivkontrollen 2xS_2xD, 2xD, 4xD und 4x18H_M2_S1, sowie die kombinierten Konstrukte 2x18H_M2_S1_2xD und 4x18H_M2_S1_2xD, welche im pBT10-LUC-Vektor vorlagen. Spalte 1 gibt die Bezeichnung der Konstrukte wieder, die Spalte 2 beinhaltet die relativen Lumineszenzeinheiten (RLU) pro mg eingesetztes Protein ohne PAMP (Pep25), sowie die Spalte 3 die entsprechenden Werte für den Ansatz mit PAMP (Pep25).

	RLU/mg ohne Pep25-Zugabe	RLU/mg mit Pep25-Zugabe
TATA-LUC	196876,71	231010,06
TATA-LUC	149866,88	145391,16
TATA-LUC	202336,92	261585,61
TATA-LUC	117260,29	117260,29
2xS_2xD	220580,20	1254283,64
2xS_2xD	266581,52	853384,04
2xS_2xD	112736,21	1127362,08
2xS_2xD	127071,58	1009961,73
2xS_2xD	198326,02	1188727,15
2x18H_M2_S1_2xD	104189,34	957528,83
2x18H_M2_S1_2xD	183046,37	1190822,86
2x18H_M2_S1_2xD	215788,29	1676018,31
2x18H_M2_S1_2xD	99087,79	906489,27
4x18H_M2_S1_2xD	76810,69	1807887,65
4x18H_M2_S1_2xD	83592,24	1213307,15
4x18H_M2_S1_2xD	139590,11	2219613,90
4x18H_M2_S1_2xD	92711,03	3477976,17
4x18H_M2_S1_2xD	78883,91	259397,07
4x18H_M2_S1	34038,95	685991,26
4x18H_M2_S1	52595,40	209047,27
4x18H_M2_S1	41557,59	261400,14
4x18H_M2_S1	44638,72	210228,72
4x18H_M2_S1	34327,37	364063,64
2xD	1119430,60	18863250,00
2xD	438201,04	4410020,50
2xD	508360,95	7972892,48
4xD	3084411,51	18686088,66
4xD	1755189,18	18950462,64
4xD	563473,65	23041190,40
4xD	1470466,79	15463719,23
4xD	1294725,41	9098979,76

Tabelle 19: Ergebnisse der gemittelten Einzelerperimente für die Negativkontrolle (TATA-LUC), die Positivkontrollen 2xS_2xD, 2xD, 4xD und 4x18H_M2_S1, sowie die kombinierten Konstrukte 2x18H_M2_S1_2xD und 4x18H_M2_S1_2xD, welche im pBT10-LUC-Vektor vorlagen. Spalte 1 gibt die Bezeichnung der Konstrukte wieder, die Spalte 2 beinhaltet die relativen Lumineszenzeinheiten (RLU) pro mg eingesetztes Protein ohne PAMP (Pep25) und Spalte 3 die Standardabweichung der Werte. Spalte 4 und 5 enthalten die entsprechenden Werte für den Ansatz mit PAMP (Pep25).

	RLU/mg ohne Pep25-Zugabe	STABW	RLU/mg mit Pep25-Zugabe	STABW
TATA-LUC	166585,20	40448,36	188811,78	68512,02
2xS_2xD	185059,11	64569,38	1086743,73	158486,83
2x18H_M2_S1_2xD	150527,95	58050,89	1182714,82	351389,32
4x18H_M2_S1_2xD	94317,60	26037,98	1795636,39	1194708,41
4x18H_M2_S1	41431,61	7746,83	346146,21	200166,97
2xD	688664,19	374700,38	10415387,66	7529827,21
4xD	1633653,31	922802,36	17048088,14	5194176,98

8.7. Abfragen-Übersichtstabelle

Tabelle 21: Ergebnisse aller an der Datenbank durchgeführten Abfragen. Spalte 1 gibt die Anzahl von 732 Abfragen wieder. Spalte 2 zeigt die Abfrage-Bezeichnung. Spalten 3-8 beinhalten, wenn vorhanden, bis zu 6 Stimuli die kombiniert abgefragt wurden. Spalte 9 zeigt an, ob es sich um eine PA-Abfrage (induzierte Gene) handelt, ob nach der Sequenzextraktion lediglich ein Gen einen TSS aufwies (=1) oder ob der untere Induktionsfaktor angehoben wurde (z. B. >2,5). Spalte 10 präsentiert die detektierte (bzw. reduzierte) Anzahl an koregulierten Genen, der in einer Zeile dargestellten Stimuli.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nr.	Abfrage	Stimulus1	Stimulus2	Stimulus3	Stimulus4	Stimulus5	Stimulus6	Info	koreg. Gene
1	3A	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	NPP1 all				98
2	3B	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all				(>2,1)	137 (111)
3	3C	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	SA				35
4	3D	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	MJ all (Affy)				25
5	3I	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	NPP1 all			PA	26
6	3J	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all				PA	45
7	3M	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	MJ all (Affy)			PA	34
8	3N	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	SA			PA	27
9	9A	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	Powdery mildew				0
10	9B	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	Chitin all				6
11	9C	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	F. virguliforme				0
12	9D	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	Ethylen all				2
13	9E	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	Ethylen all	Chitin all			0
14	9F	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	H2O2	Chitin all			1
15	9G	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	H2O2				3
16	9H	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	SA	SA-Analog			4
17	9I	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all		SA-Analog			6
18	9J	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	MJ all (Affy)	MJ (cdna)			3
19	9K	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all		MJ (cdna)			6
20	9L	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	Ethylen all	MJ all (Affy)	MJ (cdna)		0
21	9M	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	H2O2	MJ all (Affy)	MJ (cdna)		0
22	9P	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	NPP1 all	Chitin all			4
23	9Q	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	NPP1 all	Ethylen all			2

24	9R	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	Ethylen all	MJ all (Affy)			0
25	9S	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	H2O2	MJ all (Affy)			0
26	9T	B. cinerea all	E. orontii all	P. infestans all	H2O2	SA			2
27	12A	B. cinerea 18hpi	B. cinerea 48hpi					(>3,2)	350 (115)
28	12C	B. cinerea 18hpi	B. cinerea 48hpi	Chitin all					14
29	12CC	B. cinerea all		Chitin all					22
30	12D	B. cinerea 18hpi	B. cinerea 48hpi	H2O2					12
31	12DD	B. cinerea all		H2O2					28
32	12E	B. cinerea 18hpi	B. cinerea 48hpi	Ethylen all					3
33	12EE	B. cinerea all		Ethylen all					3
34	12EEE	B. cinerea 18hpi	B. cinerea 48hpi	Ethylen 2hr	Ethylen 24hr				0
35	12EEEE	B. cinerea all		Ethylen 2hr	Ethylen 24hr				0
36	12F	B. cinerea 18hpi	B. cinerea 48hpi	MJ all (Affy)					102
37	12FF	B. cinerea all		MJ all (Affy)				(>2,6)	228 (117)
38	12G	B. cinerea 18hpi	B. cinerea 48hpi	MJ (cDNA)					25
39	12GG	B. cinerea all		MJ (cDNA)					35
40	12H	B. cinerea 18hpi	B. cinerea 48hpi	SA					55
41	12HH	B. cinerea all		SA				(>2,02)	122 (115)
42	12I	B. cinerea 18hpi	B. cinerea 48hpi	SA-Analog					7
43	12II	B. cinerea all		SA-Analog					14
44	12J	B. cinerea 18hpi	B. cinerea 48hpi	NPP1 all				(>2,3)	178 (119)
45	12JJ	B. cinerea all		NPP1 all				(>3,2)	330 (112)
46	12JJJ	B. cinerea 18hpi	B. cinerea 48hpi	NPP1 1hr	NPP1 4hr				43
47	12JJJJ	B. cinerea all		NPP1 1hr	NPP1 4hr				75
48	12K	B. cinerea 18hpi	B. cinerea 48hpi	NPP1 all	Chitin all				10
49	12KK	B. cinerea all		NPP1 all	Chitin all				14
50	12LLL	B. cinerea 18hpi						(>2,6)	232 (116)
51	12MMM	B. cinerea 48hpi						(>8,3)	1121 (113)
52	12N	B. cinerea 18hpi		Chitin all					14
53	12NN	B. cinerea 48hpi		Chitin all					22
54	12a	B. cinerea all		Chitin all	SA				7
55	12b	B. cinerea all		Chitin all	SA-Analog				0
56	12c	B. cinerea all		Chitin all	MJ all (Affy)				9

57	12d	B. cinerea all		Chitin all	MJ (cDNA)				0
58	12e	B. cinerea all		Chitin all	Ethylen all				0
59	12f	B. cinerea all		Chitin all	H2O2				6
60	12g	B. cinerea all		H2O2	SA				10
61	12h	B. cinerea all		H2O2	SA-Analog				0
62	12i	B. cinerea all		H2O2	MJ all (Affy)				5
63	12j	B. cinerea all		H2O2	MJ (cDNA)				0
64	12k	B. cinerea all		H2O2	Ethylen all				0
65	12l	B. cinerea all		Ethylen all	SA				0
66	12m	B. cinerea all		Ethylen all	SA-Analog				0
67	12n	B. cinerea all		Ethylen all	MJ all (Affy)				1
68	12o	B. cinerea all		Ethylen all	MJ (cDNA)				0
69	12p	B. cinerea all		MJ (cDNA)	SA				3
70	12q	B. cinerea all		MJ (cDNA)	SA-Analog				5
71	12r	B. cinerea all		MJ (cDNA)	MJ all (Affy)				22
72	12s	B. cinerea all		MJ all (Affy)	SA				28
73	12t	B. cinerea all		MJ all (Affy)	SA-Analog				2
74	12u	B. cinerea all		SA-Analog	SA				7
75	14A	B. cinerea 48hpi	MJ 30min (Affy)						74
76	14B	B. cinerea 48hpi	MJ 1hr (Affy)					(>2,3)	157 (112)
77	14C	B. cinerea 48hpi	MJ 3hr (Affy)					(>2,2)	148 (118)
78	14D	B. cinerea 48hpi	MJ all (Affy)					(>2,6)	211 (112)
79	14E	B. cinerea 48hpi	MJ (cDNA)						33
80	14F	B. cinerea 48hpi	SA						113
81	14G	B. cinerea 48hpi	SA-Analog						12
82	14H	B. cinerea 48hpi	NPP1 1hr						94
83	14I	B. cinerea 48hpi	NPP1 4hr					(>3)	284 (115)
84	14J	B. cinerea 48hpi	NPP1 all					(>3,1)	307 (116)
85	14K	B. cinerea 48hpi	Chitin 1hr	NPP1 1hr					3
86	14L	B. cinerea 48hpi	Chitin all	NPP1 all					14
87	14M	B. cinerea 18hpi	MJ 30min (Affy)						38
88	14N	B. cinerea 18hpi	MJ 1hr (Affy)						89
89	14O	B. cinerea 18hpi	MJ 3hr (Affy)						92

90	14P	B. cinerea 18hpi	MJ all (Affy)						119
91	14Q	B. cinerea 18hpi	MJ (cDNA)						27
92	14R	B. cinerea 18hpi	SA						64
93	14S	B. cinerea 18hpi	SA-Analog						9
94	14T	B. cinerea 18hpi	NPP1 1hr						60
95	14U	B. cinerea 18hpi	NPP1 4hr					(>2,4)	188 (116)
96	14V	B. cinerea 18hpi	NPP1 all					(>2,5)	201 (111)
97	14W	B. cinerea 18hpi	Chitin 1hr	NPP1 1hr					2
98	14X	B. cinerea 18hpi	Chitin all	NPP1 all					10
99	15A	B. cinerea all	Chitin 10min						4
100	15AA	B. cinerea 18hpi	Chitin 10min						1
101	15AAA	B. cinerea 48hpi	Chitin 10min						4
102	15B	B. cinerea all	Chitin 30min						12
103	15BB	B. cinerea 18hpi	Chitin 30min						7
104	15BBB	B. cinerea 48hpi	Chitin 30min						12
105	15C	B. cinerea all	Chitin 1hr						8
106	15CC	B. cinerea 18hpi	Chitin 1hr						5
107	15CCC	B. cinerea 48hpi	Chitin 1hr						8
108	15D	B. cinerea all	Chitin 3hr						13
109	15DD	B. cinerea 18hpi	Chitin 3hr						12
110	15DDD	B. cinerea 48hpi	Chitin 3hr						13
111	15E	B. cinerea all	Chitin 6hr						1
112	15EE	B. cinerea 18hpi	Chitin 6hr						1
113	15EEE	B. cinerea 48hpi	Chitin 6hr						1
114	15F	B. cinerea all	Chitin 24hr						1
115	15FF	B. cinerea 18hpi	Chitin 24hr						1
116	15FFF	B. cinerea 48hpi	Chitin 24hr						1
117	15HH	B. cinerea 18hpi	H2O2						12
118	15HHH	B. cinerea 48hpi	H2O2						28
119	15I	B. cinerea all	Ethylen 2hr						1
120	15II	B. cinerea 18hpi	Ethylen 2hr						1
121	15III	B. cinerea 48hpi	Ethylen 2hr						1
122	15J	B. cinerea all	Ethylen 24hr						2

123	15JJ	B. cinerea 18hpi	Ethylen 24hr						2
124	15JJJ	B. cinerea 48hpi	Ethylen 24hr						2
125	15KK	B. cinerea 18hpi	Ethylen all						3
126	15KKK	B. cinerea 48hpi	Ethylen all						3
127	15L	B. cinerea all	MJ 30min (Affy)						82
128	15M	B. cinerea all	MJ 1hr (Affy)					(>2,3)	170 (120)
129	15N	B. cinerea all	MJ 3hr (Affy)					(>2,25)	156 (118)
130	15S	B. cinerea all	NPP1 1hr						103
131	15T	B. cinerea all	NPP1 4hr					(>3,15)	302 (114)
132	15V	B. cinerea all	Chitin 1hr	NPP1 1hr					3
133	16A	B. cinerea 18hpi	B. cinerea 48hpi					PA	47
134	16LL	B. cinerea 18hpi						PA	113
135	16MM	B. cinerea 48hpi						PA; (>18)	337 (118)
136	18A	B. cinerea 48hpi	MJ 30min (Affy)					PA; =1	4
137	18B	B. cinerea 48hpi	MJ 1hr (Affy)					PA	15
138	18C	B. cinerea 48hpi	MJ 3hr (Affy)					PA	17
139	18D	B. cinerea 48hpi	MJ all (Affy)					PA	25
140	18F	B. cinerea 48hpi	SA					PA	5
141	18H	B. cinerea 48hpi	NPP1 1hr					PA	21
142	18I	B. cinerea 48hpi	NPP1 4hr					PA	70
143	18J	B. cinerea 48hpi	NPP1 all					PA	85
144	18M	B. cinerea 18hpi	MJ 30min (Affy)					PA	4
145	18N	B. cinerea 18hpi	MJ 1hr (Affy)					PA	8
146	18O	B. cinerea 18hpi	MJ 3hr (Affy)					PA	8
147	18P	B. cinerea 18hpi	MJ all (Affy)					PA	12
148	18R	B. cinerea 18hpi	SA					PA	3
149	18T	B. cinerea 18hpi	NPP1 1hr					PA	17
150	18U	B. cinerea 18hpi	NPP1 4hr					PA	38
151	18V	B. cinerea 18hpi	NPP1 all					PA	47
152	19L	B. cinerea all	MJ 30min (Affy)					PA	6
153	19M	B. cinerea all	MJ 1hr (Affy)					PA	18
154	19N	B. cinerea all	MJ 3hr (Affy)					PA	20
155	19O	B. cinerea all	MJ all (Affy)					PA	29

156	19Q	B. cinerea all	SA					PA	7
157	19S	B. cinerea all	NPP1 1hr					PA	31
158	19T	B. cinerea all	NPP1 4hr					PA	85
159	19U	B. cinerea all	NPP1 all					PA	108
160	20A	P. infestans 6hpi	P. infestans 12hpi	P. infestans 24hpi				(>2,21)	153 (118)
161	20C	P. infestans 6hpi	P. infestans 12hpi	P. infestans 24hpi	Chitin all				7
162	20CC	P. infestans all			Chitin all				29
163	20D	P. infestans 6hpi	P. infestans 12hpi	P. infestans 24hpi	H2O2				3
164	20DD	P. infestans all			H2O2				23
165	20E	P. infestans 6hpi	P. infestans 12hpi	P. infestans 24hpi	Ethylen all				2
166	20EE	P. infestans all			Ethylen all				5
167	20EEE	P. infestans 6hpi	P. infestans 12hpi	P. infestans 24hpi	Ethylen 2hr	Ethylen 24hr			0
168	20EEEE	P. infestans all			Ethylen 2hr	Ethylen 24hr			1
169	20F	P. infestans 6hpi	P. infestans 12hpi	P. infestans 24hpi	MJ all (Affy)				42
170	20FF	P. infestans all			MJ all (Affy)			(>2,34)	160 (115)
171	20G	P. infestans 6hpi	P. infestans 12hpi	P. infestans 24hpi	MJ (cDNA)				6
172	20GG	P. infestans all			MJ (cDNA)				29
173	20H	P. infestans 6hpi	P. infestans 12hpi	P. infestans 24hpi	SA				41
174	20HH	P. infestans all			SA			(>2,5)	199 (115)
175	20I	P. infestans 6hpi	P. infestans 12hpi	P. infestans 24hpi	SA-Analog				4
176	20II	P. infestans all			SA-Analog				30
177	20J	P. infestans 6hpi	P. infestans 12hpi	P. infestans 24hpi	NPP1 all				82
178	20JJ	P. infestans all			NPP1 all			(>3,3)	405 (115)
179	20JJJ	P. infestans 6hpi	P. infestans 12hpi	P. infestans 24hpi	NPP1 1hr	NPP1 4hr			14
180	20JJJJ	P. infestans all			NPP1 1hr	NPP1 4hr			89
181	20K	P. infestans 6hpi	P. infestans 12hpi	P. infestans 24hpi	NPP1 all	Chitin all			4
182	20KK	P. infestans all			NPP1 all	Chitin all			15
183	20LLL	P. infestans 6hpi						(>6)	806 (118)
184	20MMM		P. infestans 12hpi					(>4)	472 (115)
185	20NNN			P. infestans 24hpi				(>3,1)	428 (117)
186	20O	P. infestans 6hpi			Chitin all				26
187	20OO		P. infestans 12hpi		Chitin all				17
188	20OOO			P. infestans 24hpi	Chitin all				11

189	20a	P. infestans all		Chitin all	SA				10
190	20b	P. infestans all		Chitin all	SA-Analog			=1	2
191	20c	P. infestans all		Chitin all	MJ all (Affy)				6
192	20d	P. infestans all		Chitin all	MJ (cDNA)				0
193	20e	P. infestans all		Chitin all	Ethylen all				1
194	20f	P. infestans all		Chitin all	H2O2				6
195	20g	P. infestans all		H2O2	SA				11
196	20h	P. infestans all		H2O2	SA-Analog				0
197	20i	P. infestans all		H2O2	MJ all (Affy)				4
198	20j	P. infestans all		H2O2	MJ (cDNA)				0
199	20k	P. infestans all		H2O2	Ethylen all				0
200	20l	P. infestans all		Ethylen all	SA				1
201	20m	P. infestans all		Ethylen all	SA-Analog				1
202	20n	P. infestans all		Ethylen all	MJ all (Affy)				1
203	20o	P. infestans all		Ethylen all	MJ (cDNA)				0
204	20p	P. infestans all		MJ (cDNA)	SA				4
205	20q	P. infestans all		MJ (cDNA)	SA-Analog				4
206	20r	P. infestans all		MJ (cDNA)	MJ all (Affy)				14
207	20s	P. infestans all		MJ all (Affy)	SA				26
208	20t	P. infestans all		MJ all (Affy)	SA-Analog				1
209	20u	P. infestans all		SA-Analog	SA				13
210	21A	P. infestans 24hpi	MJ 30min (Affy)						10
211	21B	P. infestans 24hpi	MJ 1hr (Affy)						37
212	21C	P. infestans 24hpi	MJ 3hr (Affy)						39
213	21D	P. infestans 24hpi	MJ all (Affy)						56
214	21E	P. infestans 24hpi	MJ (cDNA)						12
215	21F	P. infestans 24hpi	SA					(>2,1)	136 (120)
216	21G	P. infestans 24hpi	SA-Analog						28
217	21H	P. infestans 24hpi	NPP1 1hr						43
218	21I	P. infestans 24hpi	NPP1 4hr					(>2,1)	129 (112)
219	21J	P. infestans 24hpi	NPP1 all					(>2,15)	145 (115)
220	21K	P. infestans 24hpi	Chitin 1hr	NPP1 1hr					1
221	21L	P. infestans 24hpi	Chitin all	NPP1 all					5

222	21M	P. infestans 12hpi	MJ 30min (Affy)						25
223	21N	P. infestans 12hpi	MJ 1hr (Affy)						61
224	21O	P. infestans 12hpi	MJ 3hr (Affy)						60
225	21P	P. infestans 12hpi	MJ all (Affy)						86
226	21Q	P. infestans 12hpi	MJ (cDNA)						15
227	21R	P. infestans 12hpi	SA						79
228	21S	P. infestans 12hpi	SA-Analog						7
229	21T	P. infestans 12hpi	NPP1 1hr						65
230	21U	P. infestans 12hpi	NPP1 4hr					(>2,5)	211 (120)
231	21V	P. infestans 12hpi	NPP1 all					(>2,6)	224 (116)
232	21W	P. infestans 12hpi	Chitin 1hr	NPP1 1hr					1
233	21X	P. infestans 12hpi	Chitin all	NPP1 all					11
234	21A-2	P. infestans 6hpi	MJ 30min (Affy)						48
235	21B-2	P. infestans 6hpi	MJ 1hr (Affy)						105
236	21C-2	P. infestans 6hpi	MJ 3hr (Affy)						99
237	21D-2	P. infestans 6hpi	MJ all (Affy)					(>2,3)	142 (113)
238	21F-2	P. infestans 6hpi	MJ (cDNA)						24
239	21G-2	P. infestans 6hpi	SA						118
240	21H-2	P. infestans 6hpi	SA-Analog						17
241	21I-2	P. infestans 6hpi	NPP1 1hr						99
242	21J-2	P. infestans 6hpi	NPP1 4hr					(>3)	308 (113)
243	21K-2	P. infestans 6hpi	NPP1 all					(>3)	333 (117)
244	21L-2	P. infestans 6hpi	Chitin 1hr	NPP1 1hr					3
245	21M-2	P. infestans 6hpi	Chitin all	NPP1 all					15
246	22A	P. infestans all	Chitin 10min						5
247	22AA	P. infestans 6hpi	Chitin 10min						5
248	22AAA	P. infestans 12hpi	Chitin 10min						4
249	22AAAA	P. infestans 24hpi	Chitin 10min						1
250	22B	P. infestans all	Chitin 30min						15
251	22BB	P. infestans 6hpi	Chitin 30min						14
252	22BBB	P. infestans 12hpi	Chitin 30min						9
253	22BBBB	P. infestans 24hpi	Chitin 30min						7
254	22C	P. infestans all	Chitin 1hr						11

255	22CC	P. infestans 6hpi	Chitin 1hr						9
256	22CCC	P. infestans 12hpi	Chitin 1hr						5
257	22CCCC	P. infestans 24hpi	Chitin 1hr						4
258	22D	P. infestans all	Chitin 3hr						12
259	22DD	P. infestans 6hpi	Chitin 3hr						12
260	22DDD	P. infestans 12hpi	Chitin 3hr						9
261	22DDDD	P. infestans 24hpi	Chitin 3hr						6
262	22E	P. infestans all	Chitin 6hr						1
263	22EE	P. infestans 6hpi	Chitin 6hr						1
264	22EEE	P. infestans 12hpi	Chitin 6hr						1
265	22EEEE	P. infestans 24hpi	Chitin 6hr						1
266	22F	P. infestans all	Chitin 24hr						1
267	22FF	P. infestans 6hpi	Chitin 24hr						1
268	22FFF	P. infestans 12hpi	Chitin 24hr						1
269	22FFFF	P. infestans 24hpi	Chitin 24hr						0
270	22HH	P. infestans 6hpi	H2O2						19
271	22HHH	P. infestans 12hpi	H2O2						13
272	22HHHH	P. infestans 24hpi	H2O2						7
273	22I	P. infestans all	Ethylen 2hr						3
274	22II	P. infestans 6hpi	Ethylen 2hr						2
275	22III	P. infestans 12hpi	Ethylen 2hr						1
276	22IIII	P. infestans 24hpi	Ethylen 2hr						1
277	22J	P. infestans all	Ethylen 24hr						3
278	22JJ	P. infestans 6hpi	Ethylen 24hr						3
279	22JJJ	P. infestans 12hpi	Ethylen 24hr						2
280	22JJJJ	P. infestans 24hpi	Ethylen 24hr						2
281	22KK	P. infestans 6hpi	Ethylen all						4
282	22KKK	P. infestans 12hpi	Ethylen all						3
283	22KKKK	P. infestans 24hpi	Ethylen all						3
284	22L	P. infestans all	MJ 30min (Affy)						53
285	22M	P. infestans all	MJ 1hr (Affy)						117
286	22N	P. infestans all	MJ 3hr (Affy)						110
287	22S	P. infestans all	NPP1 1hr					(>2,03)	125 (118)

288	22T	P. infestans all	NPP1 4hr					(>3,2)	369 (119)
289	22V	P. infestans all	Chitin 1hr	NPP1 1hr					3
290	23A	P. infestans 6hpi	P. infestans 12hpi	P. infestans 24hpi				PA	82
291	23LLL	P. infestans 6hpi						PA; (>16)	495 (111)
292	23MMM	P. infestans 12hpi						PA; (>9)	295 (113)
293	23NNN	P. infestans 24hpi						PA; (>4,5)	185 (119)
294	24A	P. infestans 24hpi	MJ 30min (Affy)					PA	2
295	24B	P. infestans 24hpi	MJ 1hr (Affy)					PA	6
296	24C	P. infestans 24hpi	MJ 3hr (Affy)					PA	8
297	24D	P. infestans 24hpi	MJ all (Affy)					PA	10
298	24F	P. infestans 24hpi	SA					PA	18
299	24H	P. infestans 24hpi	NPP1 1hr					PA	21
300	24I	P. infestans 24hpi	NPP1 4hr					PA	46
301	24J	P. infestans 24hpi	NPP1 all					PA	59
302	24M	P. infestans 12hpi	MJ 30min (Affy)					PA	4
303	24N	P. infestans 12hpi	MJ 1hr (Affy)					PA	7
304	24O	P. infestans 12hpi	MJ 3hr (Affy)					PA	10
305	24P	P. infestans 12hpi	MJ all (Affy)					PA	11
306	24R	P. infestans 12hpi	SA					PA	5
307	24T	P. infestans 12hpi	NPP1 1hr					PA	28
308	24U	P. infestans 12hpi	NPP1 4hr					PA	63
309	24V	P. infestans 12hpi	NPP1 all					PA	79
310	24a	P. infestans 6hpi	MJ 30min (Affy)					PA	6
311	24b	P. infestans 6hpi	MJ 1hr (Affy)					PA	8
312	24c	P. infestans 6hpi	MJ 3hr (Affy)					PA	10
313	24d	P. infestans 6hpi	MJ all (Affy)					PA	14
314	24e	P. infestans 6hpi	SA					PA	9
315	24f	P. infestans 6hpi	NPP1 1hr					PA	36
316	24g	P. infestans 6hpi	NPP1 4hr					PA	74
317	24h	P. infestans 6hpi	NPP1 all					PA	96
318	25L	P. infestans all	MJ 30min (Affy)					PA	8
319	25M	P. infestans all	MJ 1hr (Affy)					PA	14
320	25N	P. infestans all	MJ 3hr (Affy)					PA	17

321	25O	P. infestans all	MJ all (Affy)					PA	22
322	25Q	P. infestans all	SA					PA	24
323	25S	P. infestans all	NPP1 1hr					PA	43
324	25T	P. infestans all	NPP1 4hr					PA	93
325	25U	P. infestans all	NPP1 all					PA	119
326	26CCC	E. orontii all				Chitin all			14
327	26DDD	E. orontii all				H2O2			6
328	26EEE	E. orontii all				Ethylen all			2
329	26GGG	E. orontii all				MJ all (Affy)			42
330	26HHH	E. orontii all				MJ (cDNA)			12
331	26III	E. orontii all				SA			101
332	26JJJ	E. orontii all				SA-Analog			26
333	26KKK	E. orontii all				NPP1 all		(>2,3)	195 (118)
334	26LLL	E. orontii all				NPP1 1hr	NPP1 4hr		55
335	26MMM	E. orontii all				NPP1 all	Chitin all		8
336	26NNN	E. orontii 6hpi							31
337	26OOO		E. orontii 12hpi						34
338	26PPP			E. orontii 18hpi					35
339	26QQQ				E. orontii 24hpi				30
340	26RRR	E. orontii 2dpi							19
341	26SSS		E. orontii 3dpi						96
342	26TTT			E. orontii 4dpi				(>2,5)	219 (115)
343	26UUU				E. orontii 5dpi			(>3,3)	415 (118)
344	26V	E. orontii 6hpi							1
345	26VV		E. orontii 12hpi						3
346	26VVV			E. orontii 18hpi					0
347	26VVVV				E. orontii 24hpi				1
348	26W	E. orontii 2dpi							1
349	26WW		E. orontii 3dpi						7
350	26WWW			E. orontii 4dpi					8
351	26WWWW				E. orontii 5dpi				12
352	26a	E. orontii all		Chitin all	SA				6
353	26b	E. orontii all		Chitin all	SA-Analog				1

354	26c	E. orontii all		Chitin all	MJ all (Affy)				4
355	26d	E. orontii all		Chitin all	MJ (cDNA)				0
356	26e	E. orontii all		Chitin all	Ethylen all				0
357	26f	E. orontii all		Chitin all	H2O2				2
358	26g	E. orontii all		H2O2	SA				3
359	26h	E. orontii all		H2O2	SA-Analog				0
360	26i	E. orontii all		H2O2	MJ all (Affy)				0
361	26j	E. orontii all		H2O2	MJ (cDNA)				0
362	26k	E. orontii all		H2O2	Ethylen all				0
363	26l	E. orontii all		Ethylen all	SA				0
364	26m	E. orontii all		Ethylen all	SA-Analog				0
365	26n	E. orontii all		Ethylen all	MJ all (Affy)				0
366	26o	E. orontii all		Ethylen all	MJ (cDNA)				0
367	26p	E. orontii all		MJ (cDNA)	SA				4
368	26q	E. orontii all		MJ (cDNA)	SA-Analog				2
369	26r	E. orontii all		MJ (cDNA)	MJ all (Affy)				4
370	26s	E. orontii all		MJ all (Affy)	SA				8
371	26t	E. orontii all		MJ all (Affy)	SA-Analog				1
372	26u	E. orontii all		SA-Analog	SA				9
373	27A-1	E. orontii 6hpi	MJ 30min (Affy)						1
374	27A-2	E. orontii 6hpi	MJ 1hr (Affy)						2
375	27A-3	E. orontii 6hpi	MJ 3hr (Affy)						2
376	27A-4	E. orontii 6hpi	MJ all (Affy)						4
377	27A-5	E. orontii 6hpi	MJ (cDNA)						0
378	27A-6	E. orontii 6hpi	SA						4
379	27A-7	E. orontii 6hpi	SA-Analog						2
380	27A-8	E. orontii 6hpi	NPP1 1hr						3
381	27A-9	E. orontii 6hpi	NPP1 4hr						7
382	27A-10	E. orontii 6hpi	NPP1 all						7
383	27A-11	E. orontii 6hpi	Chitin 1hr	NPP1 1hr					0
384	27A-12	E. orontii 6hpi	Chitin all	NPP1 all					0
385	27B-1	E. orontii 12hpi	MJ 30min (Affy)						0
386	27B-2	E. orontii 12hpi	MJ 1hr (Affy)						2

387	27B-3	E. orontii 12hpi	MJ 3hr (Affy)						3
388	27B-4	E. orontii 12hpi	MJ all (Affy)						4
389	27B-5	E. orontii 12hpi	MJ (cDNA)						1
390	27B-6	E. orontii 12hpi	SA						2
391	27B-7	E. orontii 12hpi	SA-Analog						2
392	27B-8	E. orontii 12hpi	NPP1 1hr						7
393	27B-9	E. orontii 12hpi	NPP1 4hr						9
394	27B-10	E. orontii 12hpi	NPP1 all						12
395	27B-11	E. orontii 12hpi	Chitin 1hr	NPP1 1hr					2
396	27B-12	E. orontii 12hpi	Chitin all	NPP1 all					2
397	27C-1	E. orontii 18hpi	MJ 30min (Affy)						1
398	27C-2	E. orontii 18hpi	MJ 1hr (Affy)						2
399	27C-3	E. orontii 18hpi	MJ 3hr (Affy)						2
400	27C-4	E. orontii 18hpi	MJ all (Affy)						3
401	27C-5	E. orontii 18hpi	MJ (cDNA)						0
402	27C-6	E. orontii 18hpi	SA						1
403	27C-7	E. orontii 18hpi	SA-Analog						2
404	27C-8	E. orontii 18hpi	NPP1 1hr						0
405	27C-9	E. orontii 18hpi	NPP1 4hr					=1	2
406	27C-10	E. orontii 18hpi	NPP1 all					=1	2
407	27C-11	E. orontii 18hpi	Chitin 1hr	NPP1 1hr					0
408	27C-12	E. orontii 18hpi	Chitin all	NPP1 all					0
409	27D-1	E. orontii 24hpi	MJ 30min (Affy)						0
410	27D-2	E. orontii 24hpi	MJ 1hr (Affy)						3
411	27D-3	E. orontii 24hpi	MJ 3hr (Affy)						2
412	27D-4	E. orontii 24hpi	MJ all (Affy)						4
413	27D-5	E. orontii 24hpi	MJ (cDNA)						0
414	27D-6	E. orontii 24hpi	SA						8
415	27D-7	E. orontii 24hpi	SA-Analog						5
416	27D-8	E. orontii 24hpi	NPP1 1hr					=1	3
417	27D-9	E. orontii 24hpi	NPP1 4hr						9
418	27D-10	E. orontii 24hpi	NPP1 all						9
419	27D-11	E. orontii 24hpi	Chitin 1hr	NPP1 1hr					0

420	27D-12	E. orontii 24hpi	Chitin all	NPP1 all					0
421	27F-1	E. orontii 2dpi	MJ 30min (Affy)						0
422	27F-2	E. orontii 2dpi	MJ 1hr (Affy)						2
423	27F-3	E. orontii 2dpi	MJ 3hr (Affy)						0
424	27F-4	E. orontii 2dpi	MJ all (Affy)						2
425	27F-5	E. orontii 2dpi	MJ (cDNA)						1
426	27F-6	E. orontii 2dpi	SA						8
427	27F-7	E. orontii 2dpi	SA-Analog						1
428	27F-8	E. orontii 2dpi	NPP1 1hr				=1		2
429	27F-9	E. orontii 2dpi	NPP1 4hr						10
430	27F-10	E. orontii 2dpi	NPP1 all						10
431	27F-11	E. orontii 2dpi	Chitin 1hr	NPP1 1hr					0
432	27F-12	E. orontii 2dpi	Chitin all	NPP1 all					1
433	27G-1	E. orontii 3dpi	MJ 30min (Affy)						0
434	27G-2	E. orontii 3dpi	MJ 1hr (Affy)						8
435	27G-3	E. orontii 3dpi	MJ 3hr (Affy)						7
436	27G-4	E. orontii 3dpi	MJ all (Affy)						12
437	27G-5	E. orontii 3dpi	MJ (cDNA)						2
438	27G-6	E. orontii 3dpi	SA						31
439	27G-7	E. orontii 3dpi	SA-Analog						7
440	27G-8	E. orontii 3dpi	NPP1 1hr						16
441	27G-9	E. orontii 3dpi	NPP1 4hr						47
442	27G-10	E. orontii 3dpi	NPP1 all						49
443	27G-11	E. orontii 3dpi	Chitin 1hr	NPP1 1hr					2
444	27G-12	E. orontii 3dpi	Chitin all	NPP1 all					5
445	27H-1	E. orontii 4dpi	MJ 30min (Affy)				=1		2
446	27H-2	E. orontii 4dpi	MJ 1hr (Affy)						10
447	27H-3	E. orontii 4dpi	MJ 3hr (Affy)						10
448	27H-4	E. orontii 4dpi	MJ all (Affy)						16
449	27H-5	E. orontii 4dpi	MJ (cDNA)						5
450	27H-6	E. orontii 4dpi	SA						48
451	27H-7	E. orontii 4dpi	SA-Analog						12
452	27H-8	E. orontii 4dpi	NPP1 1hr						30

453	27H-9	E. orontii 4dpi	NPP1 4hr						72
454	27H-10	E. orontii 4dpi	NPP1 all						77
455	27H-11	E. orontii 4dpi	Chitin 1hr	NPP1 1hr					2
456	27H-12	E. orontii 4dpi	Chitin all	NPP1 all					5
457	27I-1	E. orontii 5dpi	MJ 30min (Affy)						12
458	27I-2	E. orontii 5dpi	MJ 1hr (Affy)						23
459	27I-3	E. orontii 5dpi	MJ 3hr (Affy)						24
460	27I-4	E. orontii 5dpi	MJ all (Affy)						37
461	27I-5	E. orontii 5dpi	MJ (cDNA)						10
462	27I-6	E. orontii 5dpi	SA						92
463	27I-7	E. orontii 5dpi	SA-Analog						21
464	27I-8	E. orontii 5dpi	NPP1 1hr						64
465	27I-9	E. orontii 5dpi	NPP1 4hr					(>2,17)	155 (120)
466	27I-10	E. orontii 5dpi	NPP1 all					(>2,22)	171 (115)
467	27I-11	E. orontii 5dpi	Chitin 1hr	NPP1 1hr					3
468	27I-12	E. orontii 5dpi	Chitin all	NPP1 all					7
469	28A-1	E. orontii all	Chitin 10min						0
470	28A-2	E. orontii 6hpi	Chitin 10min						0
471	28A-3	E. orontii 12hpi	Chitin 10min						0
472	28A-4	E. orontii 18hpi	Chitin 10min						0
473	28A-5	E. orontii 24hpi	Chitin 10min						0
474	28A-6	E. orontii 2dpi	Chitin 10min						0
475	28A-7	E. orontii 3dpi	Chitin 10min						0
476	28A-8	E. orontii 4dpi	Chitin 10min						0
477	28A-9	E. orontii 5dpi	Chitin 10min						0
478	28B-1	E. orontii all	Chitin 30min						10
479	28B-2	E. orontii 6hpi	Chitin 30min						1
480	28B-3	E. orontii 12hpi	Chitin 30min						3
481	28B-4	E. orontii 18hpi	Chitin 30min						0
482	28B-5	E. orontii 24hpi	Chitin 30min						3
483	28B-6	E. orontii 2dpi	Chitin 30min						1
484	28B-7	E. orontii 3dpi	Chitin 30min						5
485	28B-8	E. orontii 4dpi	Chitin 30min						6

486	28B-9	E. orontii 5dpi	Chitin 30min						8
487	28C-1	E. orontii all	Chitin 1hr						6
488	28C-2	E. orontii 6hpi	Chitin 1hr						0
489	28C-3	E. orontii 12hpi	Chitin 1hr						2
490	28C-4	E. orontii 18hpi	Chitin 1hr						0
491	28C-5	E. orontii 24hpi	Chitin 1hr						0
492	28C-6	E. orontii 2dpi	Chitin 1hr						0
493	28C-7	E. orontii 3dpi	Chitin 1hr						4
494	28C-8	E. orontii 4dpi	Chitin 1hr						4
495	28C-9	E. orontii 5dpi	Chitin 1hr						6
496	28D-1	E. orontii all	Chitin 3hr						8
497	28D-2	E. orontii 6hpi	Chitin 3hr						1
498	28D-3	E. orontii 12hpi	Chitin 3hr						2
499	28D-4	E. orontii 18hpi	Chitin 3hr						0
500	28D-5	E. orontii 24hpi	Chitin 3hr						1
501	28D-6	E. orontii 2dpi	Chitin 3hr						0
502	28D-7	E. orontii 3dpi	Chitin 3hr						5
503	28D-8	E. orontii 4dpi	Chitin 3hr						5
504	28D-9	E. orontii 5dpi	Chitin 3hr						7
505	28F-1	E. orontii all	Chitin 6hr						1
506	28F-2	E. orontii 6hpi	Chitin 6hr						0
507	28F-3	E. orontii 12hpi	Chitin 6hr						0
508	28F-4	E. orontii 18hpi	Chitin 6hr						0
509	28F-5	E. orontii 24hpi	Chitin 6hr						0
510	28F-6	E. orontii 2dpi	Chitin 6hr						0
511	28F-7	E. orontii 3dpi	Chitin 6hr						1
512	28F-8	E. orontii 4dpi	Chitin 6hr						1
513	28F-9	E. orontii 5dpi	Chitin 6hr						1
514	28G-1	E. orontii all	Chitin 24hr						0
515	28G-2	E. orontii 6hpi	Chitin 24hr						0
516	28G-3	E. orontii 12hpi	Chitin 24hr						0
517	28G-4	E. orontii 18hpi	Chitin 24hr						0
518	28G-5	E. orontii 24hpi	Chitin 24hr						0

519	28G-6	E. orontii 2dpi	Chitin 24hr						0
520	28G-7	E. orontii 3dpi	Chitin 24hr						0
521	28G-8	E. orontii 4dpi	Chitin 24hr						0
522	28G-9	E. orontii 5dpi	Chitin 24hr						0
523	28H-2	E. orontii 6hpi	H2O2						2
524	28H-3	E. orontii 12hpi	H2O2						1
525	28H-4	E. orontii 18hpi	H2O2						0
526	28H-5	E. orontii 24hpi	H2O2						1
527	28H-6	E. orontii 2dpi	H2O2						0
528	28H-7	E. orontii 3dpi	H2O2						1
529	28H-8	E. orontii 4dpi	H2O2						1
530	28H-9	E. orontii 5dpi	H2O2						5
531	28I-1	E. orontii all	Ethylen 2hr						0
532	28I-2	E. orontii 6hpi	Ethylen 2hr						0
533	28I-3	E. orontii 12hpi	Ethylen 2hr						0
534	28I-4	E. orontii 18hpi	Ethylen 2hr						0
535	28I-5	E. orontii 24hpi	Ethylen 2hr						0
536	28I-6	E. orontii 2dpi	Ethylen 2hr						0
537	28I-7	E. orontii 3dpi	Ethylen 2hr						0
538	28I-8	E. orontii 4dpi	Ethylen 2hr						0
539	28I-9	E. orontii 5dpi	Ethylen 2hr						0
540	28J-1	E. orontii all	Ethylen 24hr						2
541	28J-2	E. orontii 6hpi	Ethylen 24hr						0
542	28J-3	E. orontii 12hpi	Ethylen 24hr						0
543	28J-4	E. orontii 18hpi	Ethylen 24hr						0
544	28J-5	E. orontii 24hpi	Ethylen 24hr						1
545	28J-6	E. orontii 2dpi	Ethylen 24hr						0
546	28J-7	E. orontii 3dpi	Ethylen 24hr						2
547	28J-8	E. orontii 4dpi	Ethylen 24hr						1
548	28J-9	E. orontii 5dpi	Ethylen 24hr						1
549	28K-2	E. orontii 6hpi	Ethylen all						0
550	28K-3	E. orontii 12hpi	Ethylen all						0
551	28K-4	E. orontii 18hpi	Ethylen all						0

552	28K-5	E. orontii 24hpi	Ethylen all						1
553	28K-6	E. orontii 2dpi	Ethylen all						0
554	28K-7	E. orontii 3dpi	Ethylen all						2
555	28K-8	E. orontii 4dpi	Ethylen all						1
556	28K-9	E. orontii 5dpi	Ethylen all						1
557	28M-1	E. orontii all	MJ 30min (Affy)						14
558	28M-2	E. orontii all	MJ 1hr (Affy)						21
559	28M-3	E. orontii all	MJ 3hr (Affy)						23
560	28M-8	E. orontii all	NPP1 1hr						72
561	28M-9	E. orontii all	NPP1 4hr					(>2,21)	178 (118)
562	28M-11	E. orontii all	NPP1 all	NPP1 1hr					3
563	28M-12	E. orontii all	Chitin 1hr	NPP1 all					8
564	29LL	E. orontii 6hpi						PA	15
565	29MM	E. orontii 12hpi						PA	16
566	29NN	E. orontii 18hpi						PA	13
567	29OO	E. orontii 24hpi						PA	12
568	29PP	E. orontii 2dpi						PA	11
569	29QQ	E. orontii 3dpi						PA	61
570	29RR	E. orontii 4dpi						PA	73
571	29SS	E. orontii 5dpi						PA; (>3)	166 (114)
572	30A-1	E. orontii 6hpi	MJ 30min (Affy)					PA	0
573	30A-2	E. orontii 6hpi	MJ 1hr (Affy)					PA	0
574	30A-3	E. orontii 6hpi	MJ 3hr (Affy)					PA	0
575	30A-4	E. orontii 6hpi	MJ all (Affy)					PA	0
576	30A-5	E. orontii 6hpi	SA					PA	0
577	30A-6	E. orontii 6hpi	NPP1 1hr					PA	2
578	30A-7	E. orontii 6hpi	NPP1 4hr					PA	6
579	30A-8	E. orontii 6hpi	NPP1 all					PA	8
580	30B-1	E. orontii 12hpi	MJ 30min (Affy)					PA	0
581	30B-2	E. orontii 12hpi	MJ 1hr (Affy)					PA	0
582	30B-3	E. orontii 12hpi	MJ 3hr (Affy)					PA	0
583	30B-4	E. orontii 12hpi	MJ all (Affy)					PA	1
584	30B-5	E. orontii 12hpi	SA					PA	0

585	30B-6	E. orontii 12hpi	NPP1 1hr					PA	1
586	30B-7	E. orontii 12hpi	NPP1 4hr					PA	2
587	30B-8	E. orontii 12hpi	NPP1 all					PA	3
588	30C-1	E. orontii 18hpi	MJ 30min (Affy)					PA	0
589	30C-2	E. orontii 18hpi	MJ 1hr (Affy)					PA	0
590	30C-3	E. orontii 18hpi	MJ 3hr (Affy)					PA	0
591	30C-4	E. orontii 18hpi	MJ all (Affy)					PA	0
592	30C-5	E. orontii 18hpi	SA					PA	1
593	30C-6	E. orontii 18hpi	NPP1 1hr					PA	0
594	30C-7	E. orontii 18hpi	NPP1 4hr					PA	1
595	30C-8	E. orontii 18hpi	NPP1 all					PA	1
596	30D-1	E. orontii 24hpi	MJ 30min (Affy)					PA	0
597	30D-2	E. orontii 24hpi	MJ 1hr (Affy)					PA	0
598	30D-3	E. orontii 24hpi	MJ 3hr (Affy)					PA	0
599	30D-4	E. orontii 24hpi	MJ all (Affy)					PA	0
600	30D-5	E. orontii 24hpi	SA					PA	0
601	30D-6	E. orontii 24hpi	NPP1 1hr					PA	0
602	30D-7	E. orontii 24hpi	NPP1 4hr					PA	0
603	30D-8	E. orontii 24hpi	NPP1 all					PA	0
604	30F-1	E. orontii 2dpi	MJ 30min (Affy)					PA	0
605	30F-2	E. orontii 2dpi	MJ 1hr (Affy)					PA	0
606	30F-3	E. orontii 2dpi	MJ 3hr (Affy)					PA	1
607	30F-4	E. orontii 2dpi	MJ all (Affy)					PA	1
608	30F-5	E. orontii 2dpi	SA					PA	1
609	30F-6	E. orontii 2dpi	NPP1 1hr					PA	0
610	30F-7	E. orontii 2dpi	NPP1 4hr					PA	3
611	30F-8	E. orontii 2dpi	NPP1 all					PA	3
612	30G-1	E. orontii 3dpi	MJ 30min (Affy)					PA	1
613	30G-2	E. orontii 3dpi	MJ 1hr (Affy)					PA	0
614	30G-3	E. orontii 3dpi	MJ 3hr (Affy)					PA	0
615	30G-4	E. orontii 3dpi	MJ all (Affy)					PA	1
616	30G-5	E. orontii 3dpi	SA					PA	0
617	30G-6	E. orontii 3dpi	NPP1 1hr					PA	6

618	30G-7	E. orontii 3dpi	NPP1 4hr					PA	15
619	30G-8	E. orontii 3dpi	NPP1 all					PA	20
620	30H-1	E. orontii 4dpi	MJ 30min (Affy)					PA	0
621	30H-2	E. orontii 4dpi	MJ 1hr (Affy)					PA	0
622	30H-3	E. orontii 4dpi	MJ 3hr (Affy)					PA	0
623	30H-4	E. orontii 4dpi	MJ all (Affy)					PA	0
624	30H-5	E. orontii 4dpi	SA					PA; =1	2
625	30H-6	E. orontii 4dpi	NPP1 1hr					PA	8
626	30H-7	E. orontii 4dpi	NPP1 4hr					PA	22
627	30H-8	E. orontii 4dpi	NPP1 all					PA	27
628	30I-1	E. orontii 5dpi	MJ 30min (Affy)					PA	0
629	30I-2	E. orontii 5dpi	MJ 1hr (Affy)					PA	0
630	30I-3	E. orontii 5dpi	MJ 3hr (Affy)					PA	0
631	30I-4	E. orontii 5dpi	MJ all (Affy)					PA	1
632	30I-5	E. orontii 5dpi	SA					PA	5
633	30I-6	E. orontii 5dpi	NPP1 1hr					PA	13
634	30I-7	E. orontii 5dpi	NPP1 4hr					PA	44
635	30I-8	E. orontii 5dpi	NPP1 all					PA	52
636	31A	E. orontii all	MJ 30min (Affy)					PA	1
637	31B	E. orontii all	MJ 1hr (Affy)					PA	1
638	31C	E. orontii all	MJ 3hr (Affy)					PA	2
639	31D	E. orontii all	MJ all (Affy)					PA	3
640	31E	E. orontii all	SA					PA	6
641	31F	E. orontii all	NPP1 1hr					PA	16
642	31G	E. orontii all	NPP1 4hr					PA	50
643	31H	E. orontii all	NPP1 all					PA	60
644	32A-1	Chitin all							86
645	32B	H2O2							64
646	32C-1	Ethylen all							23
647	32D	SA-Analog							80
648	32G-22	SA						(>2,7)	232 (114)
649	32H-1	MJ all (Affy)							110
650	32I-1	NPP1 all						(>2,1)	136 (117)

651	32J	Powdery mildew							22
652	32K	F. virguliforme							22
653	32L	X. campestris						(>2,55)	224 (112)
654	32M-1	TMV all							59
655	32N	CJ							13
656	32O	P. infestans (cDNA)							74
657	34F	SA						PA	52
658	34G-1	MJ all (Affy)						PA	113
659	34G-2	MJ 30min (Affy)						PA	38
660	34G-3	MJ 1hr (Affy)						PA	69
661	34G-4	MJ 3hr (Affy)						PA	52
662	34H-1	NPP1 all						PA; (>5)	301 (113)
663	34H-2	NPP1 1hr						PA	99
664	34H-3	NPP1 4hr						PA; (>4)	193 (116)
665	37C	B. cinerea all	P. infestans all	E. orontii all	Flg22 all				74
666	37D	B. cinerea all	P. infestans all	E. orontii all	HrpZ all				97
667	37E	B. cinerea all	P. infestans all	E. orontii all	LPS all				5
668	37F	B. cinerea all	P. infestans all	E. orontii all	Chitin all	SA			2
669	37G	B. cinerea all	P. infestans all	E. orontii all	Chitin all	SA-Analog			0
670	37P-2	B. cinerea all	P. infestans all	E. orontii all	X. campestris				16
671	37R-2	B. cinerea all	P. infestans all	E. orontii all	TMV				0
672	38A	B. cinerea all	F. virguliforme						1
673	38B	B. cinerea all	Powdery mildew						1
674	38C	P. infestans all	F. virguliforme						0
675	38D	P. infestans all	Powdery mildew						3
676	38E	E. orontii all	F. virguliforme						3
677	38F	E. orontii all	Powdery mildew						9
678	38G	B. cinerea all	P. syringae m. (+avr)					(>2,7)	325 (120)
679	38GG	B. cinerea all	P. syringae m. (-avr)					(>2,8)	321 (116)
680	38H	B. cinerea all	P. syringae t. (+avr)					(4,9)	740 (117)
681	38HH	B. cinerea all	P. syringae t. (-avr)					(4,6)	688 (114)
682	38I	B. cinerea all	Flg22 all	HrpZ all	LPS all			(2,7)	14
683	38J	P. infestans all	P. syringae m. (+avr)						337 (111)

684	38JJ	P. infestans all	P. syringae m. (-avr)					(2,9)	377 (119)
685	38K	P. infestans all	P. syringae t. (+avr)					(4)	580 (118)
686	38KK	P. infestans all	P. syringae t. (-avr)					(3,)6	534 (119)
687	38L	P. infestans all	Flg22 all	HrpZ all	LPS all				16
688	38M	E. orontii all	P. syringae m. (+avr)					(2,6)	249 (115)
689	38MM	E. orontii all	P. syringae m. (-avr)					(2,7)	245 (119)
690	38N	E. orontii all	P. syringae t. (+avr)					(2,5)	235 (112)
691	38NN	E. orontii all	P. syringae t. (-avr)					(2,3)	201 (120)
692	38O	E. orontii all	Flg22 all	HrpZ all	LPS all				11
693	38P	B. cinerea all	X. campestris						72
694	38Q	B. cinerea all	TMV						11
695	38R	B. cinerea all	Flg22 all					(>2,9)	324 (113)
696	38S	B. cinerea all	HrpZ all					(>3,35)	411 (118)
697	38T	B. cinerea all	LPS all						17
698	38U	P. infestans all	X. campestris						82
699	38V	P. infestans all	TMV						10
700	38W	P. infestans all	Flg22 all					(>3,1)	396 (114)
701	38X	P. infestans all	HrpZ all					(>3,7)	513 (119)
702	38Y	P. infestans all	LPS all						17
703	38A-2	E. orontii all	X. campestris						51
704	38B-2	E. orontii all	TMV						10
705	38C-2	E. orontii all	Flg22 all					(>2,25)	189 (116)
706	38D-2	E. orontii all	HrpZ all					(>2,5)	222 (111)
707	38F-2	E. orontii all	LPS all						18
708	38G-2	B. cinerea all	CJ						2
709	38H-2	P. infestans all	CJ						3
710	38I-2	E. orontii all	CJ						3
711	38J-1	B. cinerea all	P. syringae p.					(>3,5)	507 (117)
712	38J-2	P. infestans all	P. syringae p.					(>3,65)	565 (118)
713	38J-3	E. orontii all	P. syringae p.					(>2,7)	270 (119)
714	38K-1	B. cinerea all	P. syringae t. (hrCc-)					(>2,8)	308 (118)
715	38K-2	P. infestans all	P. syringae t. (hrCc-)					(>3,1)	412 (116)
716	38K-3	E. orontii all	P. syringae t. (hrCc-)					(>2,5)	237 (115)

717	40A	B. cinerea all	P. infestans all	E. orontii all	Flg22 all			PA	17
718	40B	B. cinerea all	P. infestans all	E. orontii all	HrpZ all			PA	28
719	40C	B. cinerea all	P. infestans all	E. orontii all	LPS all			PA	0
720	40D	B. cinerea all	P. infestans all	E. orontii all	MJ all (Affy)	SA		PA	0
721	41A	B. cinerea all	Flg22 all	HrpZ all	LPS all			PA	0
722	41B	P. infestans all	Flg22 all	HrpZ all	LPS all			PA	0
723	41C	E. orontii all	Flg22 all	HrpZ all	LPS all			PA	0
724	41D	B. cinerea all	Flg22 all					PA	65
725	41E	B. cinerea all	HrpZ all					PA	115
726	41F	B. cinerea all	LPS all					PA	0
727	41G	P. infestans all	Flg22 all					PA	84
728	41H	P. infestans all	HrpZ all					PA; (>3)	150 (117)
729	41I	P. infestans all	LPS all					PA	0
730	41J	E. orontii all	Flg22 all					PA	38
731	41K	E. orontii all	HrpZ all					PA	69
732	41L	E. orontii all	LPS all					PA	0

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Mentor Prof. Dr. Reinhard Hehl, der mir Ende 2006 ein vorzeitiges Weihnachtsgeschenk machte, indem er mir die Möglichkeit gab meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Weiterhin bedanke ich mich für ein jederzeit offenes Ohr, gute Ratschläge, wissenschaftliche Diskussionen und Anregungen und ein „Alles wird gut!“ (wenn ich es brauchte).

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Ralf R. Mendel für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hehl möchte ich mich für die nette und freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Bei Lorenz bedanke ich mich für die Einführung in die Bioinformatik, die vielen Arbeitsstunden, die er in mich investierte, die freundliche Hilfe und den tollen Kanada-Urlaub. Bei Claudia bedanke ich mich für ihre nützlichen Tipps beim Programmieren, die Bereitstellung der TFBSite-Datenbank und die vielen praktischen Tools. Bei Elke (Nelki) für ihre chemische Kompetenz und die netten Pausen auf dem Balkon. Bei Ralph für die 1m-Notfallhotline in sämtlichen wissenschaftlichen sowie mathematischen Fragen. Bei Julia für alles, was eine gute Freundin ausmacht: Unterstützung, Hilfsbereitschaft, Panikmache, Sommerfeste mit Schlafplatz, Katzensitter; einfach eine gute Seele in meinem Leben, auf die ich mich immer verlassen kann. Bei Fabi für die nette Excelhilfe und die Pink-Lady Treffen. Bei Marlies für ihre Kompetenz alleine zu arbeiten. Dem Rest der Arbeitsgruppe C danke ich für die tolle Unterstützung.

Bei meinen Eltern und Großeltern bedanke ich mich für die finanzielle Hilfe und Ermöglichung dieser Arbeit. Meinen Eltern danke ich vor allem für das Abtauchen und die jederzeitige Unterstützung.

Bei meiner Schwester und meinen beiden kleinen Freundinnen (Bea&Karo) dafür, dass ich auch mal über andere Sachen als die Arbeit reden konnte und die netten Mädchenabende. Und für noch so vieles, was hier nicht hin passt...

Zum Schluss danke ich meiner besseren Hälfte und Lebenspartner (bald Ehemann) Jurij dafür, dass er die ganze Zeit mit Trichtern, wenig Zeit, Stress und Heuli klarkam, mich immer unterstützt hat und jederzeit für mich da war.